

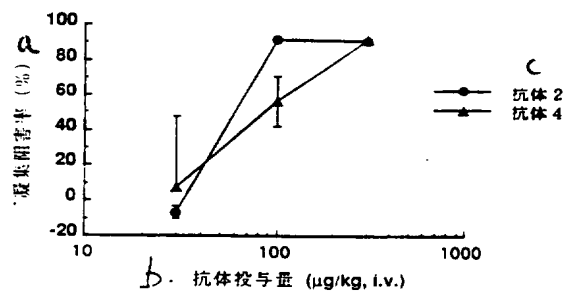


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12P 21/08, C12N 5/20, C07K 16/36 // A61K 39/395, (C12P 21/08, C12R 1:91)		A1	(11) 国際公開番号 WO96/17078
(21) 国際出願番号 (22) 国際出願日 PCT/JP95/02435 1995年11月29日(29.11.95)		(43) 国際公開日 1996年6月6日(06.06.96)	
(30) 優先権データ 特願平6/297070 1994年11月30日(30.11.94) JP		(74) 代理人 弁理士 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP)	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)(JP/JP) 〒104 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 CA, CN, FI, JP, KR, NO, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 長野充代(NAGANO, Mitsuyo)(JP/JP) 山本浩史(YAMAMOTO, Hiroshi)(JP/JP) 鬼頭守和(KITO, Morikazu)(JP/JP) 吉元良太(YOSHIMOTO, Ryota)(JP/JP) 小林 幹(KOBAYASHI, Tsuyoshi)(JP/JP) 〒210 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 中央研究所内 Kanagawa, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前であり、補正書受領の際には再公開される。 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された微生物の寄託に関する表示 国際事務局による受理の日付: 1996年3月8日(08.03.96)	

(54) Title : ANTITHROMBOTIC AGENT AND ANTI-VON WILLEBRAND FACTOR MONOCLONAL ANTIBODIES

(54) 発明の名称 抗血栓剤及び抗フォンビルブランド因子モノクローナル抗体



a ... Aggregation inhibitory rate (%)

b ... Antibody administration (Mg/kg, i.v.)

c ... Antibody

(57) Abstract

An antithrombotic agent containing as the active ingredient a monoclonal antibody that is reactive with human Von Willebrand factor, inhibits human RIPA (ristocetin-induced platelet aggregation), BIPA (botrocetin-induced platelet aggregation), and SIPA (stress-induced platelet aggregation), and does not cause bleeding even when it is administered in a quantity efficacious in exhibiting the antithrombotic effect.

(57) 要約

ヒト・フォンビルブランド因子に対して反応性を有し、ヒト血小板のRIPA（リ
ストセチン惹起血小板凝集反応）、BIPA（ボトロセチン惹起血小板凝集反応）、
及びSIPA（高ずり応力により惹起される血小板凝集反応）を阻害する作用を有し、
かつ、抗血栓作用を発揮する薬効量において出血作用を示さないモノクローナル
抗体を、抗血栓剤の有効成分とする。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DK	デンマーク	LK	スリランカ	PT	ポルトガル
AM	アルメニア	DE	ドイツ	LR	リベリア	RO	ルーマニア
AT	オーストリア	ES	スペイン	LS	レソト	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BJ	ベナン	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MK	マケドニア共和国	TG	トーゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	ML	マリ	TD	チャド
CC	中東	IS	イスラエル	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	JP	日本	MW	モザンビーク	TR	トルコ
CH	スイス	KE	ケニア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CN	中国	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	KR	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CZ	チェコ	KZ	カザフスタン	NO	ノルウェー	US	米国
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
				PL	ポーランド	VN	ベトナム

明細書

抗血栓剤及び抗フォンビルブランド因子モノクローナル抗体

技術分野

本発明は、抗血栓作用を発揮する薬効量において出血作用を示さない、ヒト・フォンビルブランド因子に対する新規なモノクローナル抗体、これを産生するハイブリドーマ、及び該モノクローナル抗体を有効成分として含有する抗血栓剤に関する。

背景技術

生体内において血管壁の傷害により内皮下組織が露出すると、血流中を流れる血小板が速やかに粘着する。これが引き金となり血小板凝集、細胞内顆粒放出といった一連の血小板活性化過程の後に血栓が形成され、止血が行われる。このように、血栓形成は生理的な止血機構に必要な不可欠であるが、一方で血栓は心筋梗塞、狭心症、脳梗塞、脳血栓といった血栓性疾患を引き起こし、社会の高齢化とともに死亡原因の上位を占める深刻な問題となっている。

現在までに、血栓性疾患の治療、予防を目的として多くの抗血栓剤が開発されてきた。しかし、これらの多くはいまだ臨床での治療有効率が低く、血栓に対する特異性が低いことや、副作用として出血傾向を起こすことが、解決すべき問題として残されている。このことは、大抵の抗血栓剤が血小板の活性化過程を阻害することしか目的としておらず、その活性の指標となるインビトロ（in vitro）での血小板凝集測定方法が、インビボ（in vivo）の複雑な血栓形成過程を反映するには不十分であることも一因と考えられている。

血栓形成は血小板膜上の糖蛋白質と内皮下組織または血漿中蛋白質が特異的に結合することにより進行する。なかでも血小板膜上のグリコプロテインIIb/IIIa（以下、「GPIIb/IIIa」と略記する）はフィブリノーゲン受容体として血栓形成の最終段階で機能するため、GPIIb/IIIa阻害剤は強力な抗血栓剤になると期待されている。GPIIb/IIIa上のフィブリノーゲン結合部位はアミノ酸のRGD一次配列で

あり、多くの RGD誘導体が合成、評価された結果、GPIIb/IIIa阻害剤は強力に血小板凝集反応を阻害することにより抗血栓作用を示すことがin vivoでの動物モデルおよび臨床治験から確認された（Thrombosis and Haemostasis、第69巻、第560頁、1993年）。しかし、同時に正常な止血機構まで抑制することにより、副作用としての出血傾向が従来の抗血栓剤よりも強く出現することが問題として浮上してきている（The Lancet、第343巻、第881頁、1994年；The New England Journal of Medicine、第330巻、第956頁、1994年）。

一方、血栓形成初期段階に機能する重要な蛋白として血小板膜上グリコプロテインIb（glycoprotein Ib；以下、「GPIb」と略記する）と血漿中フォンビルブランド因子（von Willebrand factor；以下、「vWF」と略記する）が知られている。vWFに質的、量的変化が生じた出血性病変にフォンビルブランド病（以下、「vWD」と略記する）があるが、vWD患者では血小板無力症（GPIIb/IIIaの欠損による出血性疾患）患者に比し重篤な出血が起こりにくいという臨床での知見が得られている。従って、GPIb-vWF 間の相互作用を阻害することにより、出血傾向を伴わずに強い抗血栓作用を示す可能性が考えられる。しかしながら、GPIb-vWF間の相互作用を特異的に阻害する物質としては、モノクローナル抗体と低分子化合物ATA（Aurin Tricarboxylic Acid；Blood、第72巻、第1898頁、1988年）が知られているのみである。抗GPIbモノクローナル抗体のin vivoでの抗血栓作用は未だ確認されておらず、むしろ血小板減少症を引き起こしたり、出血時間を延長することが副作用としてクローズアップされている（Blood、第70巻、344a、1987年；Jpn. J. Clin. Pathol.、第40巻、第266頁、1992年）。また、vWF側を阻害するもののうち上記のATAとマウス抗ブタvWFモノクローナル抗体BB3-BD5がin vivo動物実験で抗血栓性を示すことが報告されている（Circulation、第81巻、第1106頁、1990年）が、どちらも副作用を無視することが出来ない。すなわち、ATAは、GPIb-vWF間の相互作用を阻害して抗血栓作用を示す反面、コラーゲン、アラキドン酸、A23187、PAF、TXA₂による血小板凝集、放出反応を促進する（Thrombosis and Haemostasis 第68巻第189頁1992年）といった正反対の副作用を併せ持つ。また、BB3-BD5は、薬効量において強い出血傾向を示す（Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第84巻、第8100頁、1987年；SURGERY、第112巻、第433頁、1992年）。

以上のように、既存の抗血栓剤には、薬効としての抗血栓作用と副作用としての出血傾向とが切り離せない（薬効量と副作用量に開きがない）というジレンマが存在している。

最近、病態時の血栓形成と深い関わりがあるものとして、高ずり応力により惹起される血小板凝集反応（shear stress induced platelet aggregation；以下、「SIPA」と略記する）が注目を集めている。動脈硬化病変部位や細小動脈は血管径が狭く血流速度が大きいため、血管壁と血液との相互作用により高いずり応力が生じている。このような状況下では、血液中のvWFが活性化を受けて高次構造を変化させる結果、血栓形成において中心的役割を果たすようになる。第一に内皮下組織上に存在するvWFは、血小板膜上のGPIbと結合し、血小板を血管壁に粘着させる。第二に血漿中に存在するvWFは、血小板膜上のグリコプロテインIIb/IIIaを架橋することにより血小板凝集反応を進行させ、最終的な血栓形成に至らしめることが知られている。

抗生物質リストセチンまたは蛇毒ボトロセチンが、高ずり応力下での変化と同様の高次構造変化をin vitroでvWFに惹起させることが一般に知られている。つまり、リストセチンまたはボトロセチンが共存するとvWFはGPIbとの結合能力を獲得する。この特性を利用してvWFの生理活性をin vitroで測定する方法として、リストセチン惹起血小板凝集反応（ristocetin induced platelet aggregation；以下、「RIPA」と略記する）またはボトロセチン惹起血小板凝集反応（botrocetin induced platelet aggregation；以下、「BIPA」と略記する）や、リストセチンまたはボトロセチン存在下でのvWFのGPIbへの結合を測定する方法が広く利用されている。さらに実験技術の進歩により、実際にずり応力を付加することにより、in vitroでSIPAを測定する装置も開発された。いずれの反応においてもGPIbとの結合に関与するvWF上のドメインは同一と考えられている。

これまでに、vWFのin vitroでの活性を阻害するいくつかのvWFに対する抗体が得られてきた。しかし、これらのうちの多くは反応特異性に劣り、リストセチン依存性の反応は阻害してもボトロセチン依存性の反応を阻害しない抗体が大半を占めている。先に述べたように、リストセチン及びボトロセチンにより誘導されるvWF上のGPIb結合部位は相同と考えられている。よってこれらの抗体は、vWF上

のリストセチンあるいはボトロセチンの結合部位を認識している可能性があり、正確にはvWFの生理活性を阻害しているのではなく、反応特異性は低いといえる。そのような状況下で、藤村らによって作製されたNMC-4 (J. Nara. Med. Assoc., 第36巻第662頁1985年) と、Tuddenhamらによって作製されたRFF-VIII RAG:1の2種の抗体が、リストセチンおよびボトロセチンの両方に依存した反応を *in vitro* で阻害することが報告されている (Blood第177巻第1号第113頁、1992年)。

上記の二つの抗体のエピトープは、vWF分子のGPIb結合部位内に存在し、vWF分子のアミノ酸配列の449から728番目のアミノ酸残基の間であることが報告されている。またヨード標識したNMC-4のvWFへの結合が、RFF-VIII RAG:1により部分的に阻害されることから、両者のエピトープはかなり近接していると考えられている。またRFF-VIII RAG:1がBIPAを部分的にしか阻害しないのに対し、NMC-4は完全に阻害することから、vWFの研究分野ではNMC-4を用いた研究が熱心に行われ、一定の成果を上げてきている。尚、NMC-4は、ヒト以外の動物では、ラットvWFとのみ反応性を有する。

ヒトvWFに対するモノクローナル抗体を、ヒトvWFのGPIb結合部位に関する情報を得ようとする場合や、vWFが関与する疾患に対する予防薬および治療薬として使用することを目的とする場合には、ヒトvWFに対する特異性の高いモノクローナル抗体が望ましいと考えられる。

一方、通常の新薬開発において、予め動物試験をすることなくヒトでの試験を行うことは許されないことであり、vWFや抗vWFモノクローナル抗体の *in vivo* における生理活性に関して試験を行うならば、動物試験が可能なモノクローナル抗体、すなわち、ヒト以外の動物のvWFに対しても反応性を有するモノクローナル抗体が必要となる。ところで、ヒト血小板のフィブリノーゲンを介した凝集を強力に抑制するGPIIb/IIIa拮抗薬がラットには効かない (Thrombosis and Haemostasis 第70巻第531頁1993年) ことや、ラットはリストセチン凝集を起こさないことから、ラットとヒトではその血栓形成機構が大きく異なっていると一般には考えられていることから、抗vWF抗体の抗血栓作用をラットを用いて評価することはほとんど意味がない。それに対し、モルモットでは、GPIIb/IIIa拮抗薬により血小板凝集

が抑制されるばかりではなく、リストセチン凝集もヒト同様に惹起されることから、抗血栓作用を評価する場合のin vivo実験動物血栓モデルにはモルモットが最も適していると考えられる。

以上の観点から、ヒトvWFのみに反応性を有するモノクローナル抗体、及びヒトvWFとモルモットvWFの両方に反応性を有するモノクローナル抗体は、いずれも有用性があるが、このような抗ヒトvWFモノクローナル抗体は知られていない。

また、in vivoで抗血栓作用を有することが確認された抗ヒトvWFモノクローナル抗体は知られていない。

発明の開示

本発明は、上記観点からなされたものであり、抗血栓作用を発揮する薬効量において出血作用を示さないヒト・フォンビルブランド因子に対するモノクローナル抗体、特にヒトvWFのみに反応性を有するモノクローナル抗体及びモルモットvWFにも反応性を有するモノクローナル抗体、これらを産生するハイブリドーマ、及びこれらのモノクローナル抗体を有効成分として含有する抗血栓剤を提供することを課題とする。

本発明者らはヒトvWFをマウスに免疫し、免疫したマウスの脾細胞とマウスの骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作成し、ヒト・フォンビルブランド因子に対して反応性を有し、ヒト血小板のRIPA、BIPA、及びSIPAを阻害する作用を有するモノクローナル抗体を得ることに成功し、さらに、このモノクローナル抗体がin vivo血栓モデルにおいて出血を伴わずに強い抗血栓作用を示すことを見だし、本発明を完成させた。

すなわち本願発明は、ヒト・フォンビルブランド因子に対して反応性を有し、ヒト血小板のRIPA（リストセチン惹起血小板凝集反応）、BIPA（ボトロセチン惹起血小板凝集反応）、及びSIPA（高ずり応力により惹起される血小板凝集反応）を阻害する作用を有し、かつ、抗血栓作用を発揮する薬効量において出血作用を示さないモノクローナル抗体を有効成分として含有する抗血栓剤である。

また本願発明は、下記性質を有するモノクローナル抗体、

- (a) ヒト・フォンビルブランド因子に対して反応性を有する。
 - (b) ヒト血小板のRIPA（リストセチン惹起血小板凝集反応）、BIPA（ボトロセチン惹起血小板凝集反応）、及びSIPA（高ずり応力により惹起される血小板凝集反応）を阻害する。
 - (c) モルモット血小板のRIPA（リストセチン惹起血小板凝集反応）及びBIPA（ボトロセチン惹起血小板凝集反応）を阻害する。
 - (d) モルモット生体内で強い抗血栓作用を示すが、出血は引き起こさない。
- 及び、下記性質を有するモノクローナル抗体を提供する。
- (イ) ヒト・フォンビルブランド因子に対して反応特異性を有する。
 - (ロ) ヒト血小板のRIPA（リストセチン惹起血小板凝集反応）、BIPA（ボトロセチン惹起血小板凝集反応）、及びSIPA（高ずり応力により惹起される血小板凝集反応）を阻害する。
 - (ハ) ラット、モルモット、及びウサギのフォンビルブランド因子とは反応しない。

さらに本願発明は、フォンビルブランド因子で免疫されたマウスの脾細胞とSp 2/0-Ag14マウス骨髓腫細胞との融合によって形成され、上記性質を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供する。

以下本発明を詳細に説明する。

< 1 > 本発明のモノクローナル抗体

本発明のモノクローナル抗体の第一の態様（以下、「第一のモノクローナル抗体」という）は、以下の性質を有するモノクローナル抗体である。

- (a) ヒト・フォンビルブランド因子に対して反応性を有する。
- (b) ヒト血小板のRIPA（リストセチン惹起血小板凝集反応）、BIPA（ボトロセチン惹起血小板凝集反応）、及びSIPA（高ずり応力により惹起される血小板凝集反応）を阻害する。
- (c) モルモット血小板のRIPA（リストセチン惹起血小板凝集反応）及びBIPA（ボトロセチン惹起血小板凝集反応）を阻害する。
- (d) モルモット生体内で強い抗血栓作用を示すが、出血は引き起こさない。

上記モノクローナル抗体の具体的態様として、上記性質に加え、さらに下記性質を有するモノクローナル抗体が挙げられる。

(e) ラット血小板のBIPA（ボトロセチン惹起血小板凝集反応）を阻害する。

(f) ウサギ血小板のBIPA（ボトロセチン惹起血小板凝集反応）を阻害する。

すなわち、本発明の第一のモノクローナル抗体は、ヒトvWFと反応性であり、高い親和性を持ち、RIPA、BIPA、SIPAいずれもin vitroで強く阻害する点で高い反応特異性を持つ。その一方で、少なくともモルモットのRIPAおよびBIPAを阻害する。後記実施例で得られたモノクローナル抗体は、さらにラット及びウサギのBIPAもin vitroで阻害する。またモルモットに静脈内単回投与した実験において、血液学的パラメーターおよび凝固系パラメーターに全く影響を与えず、エクス・ビボ（ex vivo）でRIPA、BIPAを阻害する。さらにモルモットを用いた光増感反応惹起血栓モデルにおける大腿動脈閉塞時間および動静脈シャント形成モデルにおける閉塞時間を延長し、かつその薬効量において出血時間の延長を示さずに効果が長時間持続する。

このような性質を有するモノクローナル抗体は従来全く知られておらず、新規なモノクローナル抗体である。本発明の第一のモノクローナル抗体は動物vWFと反応するという点ばかりではなく、NMC-4のvWFに対する結合を全く阻害しないという点で、上記NMC-4とは明らかにエピトープが異なっている（後記実施例参照）。また本発明のモノクローナル抗体が、in vivo血栓モデルにおいて出血傾向を伴わずに血栓形成を強力に抑制したということは理想的な血栓性疾患の治療薬としても利用できる可能性を強く示唆しており、新規であるというばかりではなく産業上有用な抗体である。

すなわち、本発明の第一のモノクローナル抗体は、vWFのGPIb結合部位の特定に有用であるばかりではなく、生体内でのvWFの分布、存在形態を解析したり、vWD（フォンビルブランド病）の病因を探る手段として用いたり、あるいは血栓性疾患の有効な予防薬、治療薬として利用することが期待できる。さらに、本発明の第一のモノクローナル抗体は、抗血栓作用を評価する場合のモルモット等を用いたin vivo実験に好適に使用することができる。

本発明のモノクローナル抗体の第二の態様（以下、「第二のモノクローナル抗体」という）は、以下の性質を有するモノクローナル抗体である。

（イ）ヒト・フォンビルブランド因子に対して反応特異性を有する。

（ロ）ヒト血小板のRIPA（リストセチン惹起血小板凝集反応）、BIPA（ボトロセチン惹起血小板凝集反応）、及びSIPA（高ずり応力により惹起される血小板凝集反応）を阻害する。

（ハ）ラット、モルモット、及びウサギのフォンビルブランド因子とは反応しない。

すなわち、本発明の第二のモノクローナル抗体は、ヒトvWFに対して反応性であり、高い親和性を持ち、RIPA、BIPA、SIPAのいずれをもin vitroで強く阻害するばかりでなく、ラット、モルモット、ウサギいずれのvWFとも反応しない。この点で、NMC-4よりもさらに高い特異性を持つ。

このような性質を有するモノクローナル抗体も、従来全く知られておらず、新規なモノクローナル抗体である。この第二のモノクローナル抗体は、ラットvWFと反応しない点ばかりではなく、NMC-4のvWFに対する結合を全く阻害しないという点から、上記NMC-4とは明らかにエピトープが異なっている（後記実施例参照）。またヒト以外のvWF、例えばラットvWFと本発明のモノクローナル抗体が反応しないということは、本発明のモノクローナル抗体が進化の過程で保存されていない、ヒトにおいて特異的な特別な抗原決定基を認識していると考えられ、その特異性の高さを裏付けるものと考えられ、本発明のモノクローナル抗体は新規であるというばかりではなく産業上有用である。

第二のモノクローナル抗体は、ヒトvWFと血小板膜上GPIbとの結合を特異的かつ強力に阻害することから、第一のモノクローナル抗体と同様に、ヒトvWFのGPIb結合部位の特定、生体内でのヒトvWFの分布、存在形態の解析、vWD（フォンビルブランド病）の病因を探る手段として利用することができる。また、第二のモノクローナル抗体は、ヒト以外の動物のvWFとは反応しないので、動物を用いたin vivoの血栓形成抑制実験は行われていないが、後記実施例に示すように、vWFを認識するエピトープが第一のモノクローナル抗体が認識するエピトープと近傍にあり、同一のエピトープを認識している可能性が高い。したがって、インビボでも第一

のモノクローナル抗体と同様の効果を有するものと推定され、血栓性疾患の有効な予防薬、治療薬として理由することができることが期待される。

なお、第一及び第二のモノクローナル抗体は、ヒト血小板の高ずり応力により惹起される血小板粘着反応 (shear stress induced platelet adhesion; 以下「SIPAd」と略記する) を阻害する作用も有している。SIPAdも病態時の血栓形成と関わりがあるが、正常ヒト血液を用いた実験により、第一及び第二のモノクローナル抗体は用量依存的にSIPAdを阻害することが確認されている。このような阻害は、現在抗血栓剤として期待されているGIIb/IIIa阻害剤では認められなかった。

また、本発明のモノクローナル抗体の第三の態様は、ヒトvWF因子に対して反応性を有するモノクローナル抗体であって、第一及び第二のモノクローナル抗体と共存させたときに、これらのモノクローナル抗体とvWF因子との結合を阻害する作用を有するモノクローナル抗体である。後記実施例に示すように、第一のモノクローナル抗体及び第二のモノクローナル抗体は、各々vWFとの結合を互いに阻害し、エピトープが近接あるいは同一であること、及び第一のモノクローナル抗体がin vivo血栓モデルにおいて出血傾向を伴わずに血栓形成を強力に抑制した。このことから、第一及び第二のモノクローナル抗体が有するRIPA、BIPA及びSIPAを阻害し、抗血栓作用を示すが出血は引き起こさないという性質は、これらの抗体が認識するエピトープに由来すると考えられる。したがって、これらのモノクローナル抗体とvWF因子との結合を阻害する作用を有するモノクローナル抗体も、本発明の抗血栓剤の有効成分として使用することができると考えられる。

前記の性質を有するモノクローナル抗体は医薬として用いることができる。医薬として具体的には後述するような抗血栓剤が挙げられる。

< 2 > 本発明のハイブリドーマ及びモノクローナル抗体の製造

本発明のモノクローナル抗体は、ヒトvWFで免疫された動物の抗体産生細胞と、骨髓腫 (ミエローマ) 細胞とを細胞融合することによってハイブリドーマを形成させ、ヒトvWFに対して反応特異性を有し、ヒト血小板のRIPA、BIPA及びSIPAを阻害するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをクローニングし、このハイブリドーマあるいはその変種を培養することによって得られる。

モノクローナル抗体として、モルモット血小板のRIPA及びBIPAを阻害するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをクローニングし、このハイブリドーマあるいはその変種を培養することによって、第一のモノクローナル抗体が得られる。また、ラット、モルモット、及びウサギのvWFとは反応しないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをクローニングし、このハイブリドーマあるいはその変種を培養することによって、第二のモノクローナル抗体が得られる。

ハイブリドーマは、ケーラーとミルステインの方法（Nature, 495～492頁、1975年）によって調製することができる。以下にハイブリドーマの作製法、及び目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選択法を説明する。

抗体産生細胞は、ヒトvWFを用いて、例えばBalb/c系マウスなどの動物を免疫し、その動物から脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血液等の抗体産生細胞を調製することにより得られる。ヒトvWFは、ヒト血漿からゲル濾過等により精製することによって入手できる。

ヒトvWFで免疫した動物から抗体産生細胞を採取し、骨髓腫細胞との細胞融合を行う。細胞融合に使用する骨髓腫細胞には種々の哺乳動物の細胞株を利用することができるが、抗体産生細胞の調製に用いた動物と同種の動物の細胞株を使用するのが好ましい。また、骨髓腫細胞株は、細胞融合の後に未融合細胞と融合細胞とを区別できるようにするために、未融合の骨髓腫細胞が生存できずハイブリドーマだけが増殖できるように、マーカーを有するものを用いることが好ましい。例えば、8-アザグアニン耐性の骨髓腫細胞と正常細胞である抗体産生細胞との融合により形成されるハイブリドーマは、ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを含む培地（HAT培地）中で増殖が可能であるのに対し、8-アザグアニン耐性の骨髓腫細胞はHAT培地で死滅し、正常抗体産生細胞も長期培養はできない。したがって、ハイブリドーマのみを選択的に培養することができる（サイエンス 第145巻709頁、1964年）。また、骨髓腫細胞として、固有のイムノグロブリンを分泌しない株を使用することが、ハイブリドーマの培養上清から目的の抗体を取得することが容易となる点で好ましい。

細胞融合は、例えば以下のようにして行う。ヒトvWFで免疫したマウスの脾臓と

対数増殖期にあるマウスミエローマ細胞、例えばSp2/0-Ag14（ γ -アザグアニン耐性、IgG非分泌）とを、脾細胞とミエローマ細胞が10：1～1：1程度となるように混合し、遠沈後、沈渣に平均分子量1,000～6,000のポリエチレングリコールを、最終濃度が30～50%となるように加えて細胞を融合させる。ポリエチレングリコールを加える代わりに、細胞混合液に電気パルスを加加することによって融合させてもよい。

融合処理を行った細胞は、HAT培地、例えばヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン、10%仔ウシ胎仔血清を含むダルベッコ氏変法イーグル氏最小必須培地（Dalbecco's modified minimum essential medium；以下DMEM培地と略称する）などに懸濁させ、96穴マイクロタイタープレートなどに分注し、37℃、5%二酸化炭素中で培養し、ハイブリドーマのみを生育させる。

上記のようにして得られるハイブリドーマは、目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの他に、ヒトvWFに混在する他のタンパクに対するモノクローナル抗体、あるいはヒトvWFのRIPA、BIPA及びSIPAに関与しない部位に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマとの混合培養物であるので、これらの中から目的のモノクローナル抗体を産生する株を選択する。

ヒトvWFに対して反応性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、ヒトvWFを抗原とする酵素免疫法によって選択できる。また、ヒトvWFのRIPA及びBIPAの両方を阻害するモノクローナル抗体を産生する株は、各ウェルの培地の一部を用いて、RIPA及びBIPAに対する阻害活性を測定することによって選択される。

さらに、ELISA（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）法などの酵素免疫測定法によって、モルモット、ラット、ウサギ等の動物のvWFに結合するモノクローナル抗体、あるいはこれらの動物の血小板のBIPAあるいはRIPAを阻害するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択することによって、本発明の第一のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが得られる。また、ラット、モルモット、ウサギ等のヒト以外の動物のvWFに対して反応性を示さないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択することによって、本発明の第二のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが得られる。

目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを含むことが確認されたら、HAT培地からアミノプテリンを除いたHT培地に移してさらに培養し、限界希釈法などによりクローニングを行う。

このようにして、後記実施例で得られたハイブリドーマAJvW-1、AJvW-2、AJvW-3およびAJvW-4は、いずれも平成6年8月24日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）にそれぞれ順にFERM P-14486、FERM P-14487、FERM P-14488及びFERM P-14489の受託番号で寄託され、平成7年9月29日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管されて、それぞれ順にFERM BP-5247、FERM BP-5248、FERM BP-5249、FERM BP-5250の受託番号で寄託されている。これらのハイブリドーマのうち、AJvW-2及びAJvW-4は第一のモノクローナル抗体を産生し、AJvW-1及びAJvW-3は第二のモノクローナル抗体を産生する。

尚、後記実施例に示すように、AJvW-1及びAJvW-3の産生するモノクローナル抗体のサブクラスはIgG2aアイソタイプ、AJvW-2の産生するモノクローナル抗体のサブクラスはIgG1、AJvW-4の産生するモノクローナル抗体のサブクラスはIgG2bであり、NMC-4は今までの報告にあるようにIgG1である。

本発明のモノクローナル抗体は、上記のようにして得られるハイブリドーマあるいはこれらのハイブリドーマを限界希釈法等の方法でさらにクローニングして選ばれる変種、例えば抗体産生性が高いハイブリドーマの変種を、好適な培地、あるいはマウス腹水中で培養することによって得られる。また、得られたハイブリドーマから抗体産生遺伝子を単離して発現ベクターに組み込み、これを大腸菌等の微生物に導入し、得られる抗体産生微生物を培養することによっても得られる。ハイブリドーマとしては、前記AJvW-1、AJvW-2、AJvW-3、AJvW-4、及びこれらの変種が挙げられる。

上記ハイブリドーマを培養する培地としては、DMEM培地にウシ胎仔血清、L-グルタミン、グルコース、ピルビン酸ナトリウム、2-メルカプトエタノールおよび抗生物質（例えばペニシリンG、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン等）を含有せしめた培地等が挙げられる。本発明におけるハイブリドーマを、通常、培地中

で37℃、5%二酸化炭素及び95%空気の気相で2～4日間、あるいは2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン（例えば商品名プリスタン、シグマ社）で前処置されたBalb/c系マウスの腹腔内にて10～15日間程度培養することにより、精製可能な量のモノクローナル抗体が生産される。

このようにして製造されたモノクローナル抗体は、培養上清或いは腹水からの蛋白質の単離精製に採用される常法によって、分離精製することが出来る。そのような方法としては例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、プロテイン-Aアガロース、プロテイン-Gアガロース等によるカラムクロマトグラフィー等が挙げられる。

< 3 > 本発明の抗血栓剤

本発明の抗血栓剤は、ヒト・フォンビルブランド因子に対して反応性を有し、ヒト血小板のRIPA（リストセチン惹起血小板凝集反応）、BIPA（ボトロセチン惹起血小板凝集反応）、及びSIPA（高ずり応力により惹起される血小板凝集反応）を阻害する作用を有し、かつ、抗血栓作用を発揮する薬効量において出血作用を示さないモノクローナル抗体を有効成分として含有する。このようなモノクローナル抗体として、具体的には本発明の第一のモノクローナル抗体及び第二のモノクローナル抗体が挙げられる。また、前述したように、第一及び第二のモノクローナル抗体と共存させたときに、これらのモノクローナル抗体とvWF因子との結合を阻害する作用を有するモノクローナル抗体も、第一及び第二のモノクローナル抗体と同様の作用を有し、本発明の抗血栓剤の有効成分として使用することが期待される。

マウス由来のモノクローナル抗体を抗血栓剤としてヒトに応用する場合は、抗原性の問題、血中半減期の問題があるので、ヒト型に改変した方が望ましい。反応特異性を失うことなく抗体の可変部をヒト型に変換する方法は、Jonesら（Nature、第321巻、第522頁、1986年）やQueenら（Proc. Natl. Acad. Sci., USA、第86巻、第10029頁、1989年）記載の方法により行うことができる。また、最近では、Winterら、Lernerらのレパトワクローニング法（J. Mol. Biol., 第222巻、第581頁、1991年；Proc. Natl. Acad. Sci., USA、第88巻、第2432頁、1991年）によ

っても行うことができる。

また、上記モノクローナル抗体をトリプシン、パパイン、ペプシンなどの蛋白分解酵素により消化し精製することにより得ることのできる断片 $F(ab')_2$ 、 Fab' 及び Fab も上記モノクローナル抗体と同様の性質を有する限り抗血栓剤として使用することができる。

本発明の抗血栓剤の剤型としては、注射剤、舌下剤、経皮パップ剤、錠剤、カプセル剤、細粒剤、シロップ剤、座薬、軟膏剤、点眼剤等が挙げられる。これらのうちでは、注射剤、舌下剤、経皮パップ剤が好ましい。また、剤型に応じて、製剤上許容される賦形剤、例えば、乳糖、バレイショデンプン、炭酸カルシウム、又はアルギン酸ナトリウム等を配剤してもよい。注射剤の場合には、溶媒として注射用蒸留水、生理食塩水、リンゲル液等が使用され、これに分散剤を添加してもよい。また、抗vWFモノクローナル抗体以外の抗血栓成分を併用してもよい。

本発明の抗血栓剤の投与量としては、患者の年齢、症状等により異なるが、一般には静脈投与では成人1人1日当り、有効成分であるモノクローナル抗体の量として、好ましくは、 $0.1 \mu g/kg \sim 1000 mg/kg$ の範囲であり、更に好ましくは、 $1 \mu g/kg \sim 100 mg/kg$ の範囲で用いることにより、所期の効果が期待できる。

本発明の抗血栓剤の適用については、一般的な抗血栓剤の適応が考えられる。すなわち、血小板粘着、凝集が関与する疾患の予防または治療であり、具体的には、一過性脳虚血、不安定狭心症、脳梗塞、心筋梗塞、末梢動脈閉塞症、PTCA後の再閉塞予防、冠動脈バイパスグラフトの閉塞予防、弁置換術、本態性血小板血症等に、本発明の抗血栓剤は有効である。

図面の簡単な説明

図1は、本実施例の抗体2、抗体4および比較対照であるNMC-4のヒトPRPを用いたRIPAにおける凝集阻害活性を示す図である。

図2は、本実施例の抗体1、抗体3および比較対照であるNMC-4のヒトPRPを用いたRIPAにおける凝集阻害活性を示す図である。

図3は、抗体2、抗体4およびNMC-4のモルモットPRPを用いたRIPAにおける凝

集阻害活性を示す図である。

図 4 は、抗体 2、抗体 4 および NMC-4 のヒト PRP を用いた BIPA における凝集阻害活性を示す図である。

図 5 は、抗体 1、抗体 3 および NMC-4 のヒト PRP を用いた BIPA における凝集阻害活性を示す図である。

図 6 は、抗体 2、抗体 4 および NMC-4 のモルモット PRP を用いた BIPA における凝集阻害活性を示す図である。

図 7 は、抗体 2、抗体 4 および NMC-4 のラット PRP を用いた BIPA における凝集阻害活性を示す図である。

図 8 は、抗体 2、抗体 4 および NMC-4 のウサギ PRP を用いた BIPA における凝集阻害活性を示す図である。

図 9 は、抗体 1、抗体 3 および NMC-4 のウサギ PRP を用いた BIPA における凝集阻害活性を示す図である。

図 10 は、抗体 2、抗体 4 および NMC-4 のヒト PRP を用いた SIPA における凝集阻害活性を示す図である。

図 11 は、抗体 1、抗体 3 および NMC-4 のヒト PRP を用いた SIPA における凝集阻害活性を示す図である。

図 12 は、抗体 2、抗体 4 および NMC-4 のヒト固定化血小板への vWF 結合（リストセチン存在下）に対する影響を示す図である。

図 13 は、抗体 1、抗体 3 および NMC-4 のヒト固定化血小板への vWF 結合（リストセチン存在下）に対する影響を示す図である。

図 14 は、抗体 2、抗体 4 および NMC-4 のヒト固定化血小板への vWF 結合（ボトロセチン存在下）に対する影響を示す図である。

図 15 は、抗体 1、抗体 3 および NMC-4 のヒト固定化血小板への vWF 結合（ボトロセチン存在下）に対する影響を示す図である。

図 16 は、ビオチン化 AJvW-1 の固相化 vWF への結合に対する各モノクローナル抗体の効果を示す図である。

図 17 は、ビオチン化 AJvW-2 の固相化 vWF への結合に対する各モノクローナル抗体の効果を示す図である。

図 18 は、ビオチン化AJvW-3の固相化vWFへの結合に対する各モノクローナル抗体の効果を示す図である。

図 19 は、ビオチン化AJvW-4の固相化vWFへの結合に対する各モノクローナル抗体の効果を示す図である。

図 20 は、ビオチン化NMC-4の固相化vWFへの結合に対する各モノクローナル抗体の効果を示す図である。

図 21 は、抗体 2 および抗体 4 のex vivoモルモットRIPAにおける凝集阻害効果を示す図である。

図 22 は、抗体 4 のex vivoモルモットBIPAにおける凝集阻害効果を示す図である。

図 23 は、抗体 2 のモルモットPITモデルにおける閉塞時間への影響を示す図である。

図 24 は、抗体 4 のモルモットPITモデルにおける閉塞時間への影響を示す図である。

図 25 は、抗体 2 のモルモットA-Vシャントモデルにおける閉塞時間への影響を示す図である。

図 26 は、抗体 2 のモルモット出血時間モデルにおける出血時間への影響を示す図である。

図 27 は、抗体 4 のモルモット出血時間モデルにおける出血時間への影響を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例により、本発明をさらに具体的に説明する。もっとも、本発明は、下記実施例に限定されるものではない。

実施例

< 1 >モノクローナル抗体の作製

(1) 免疫感作および細胞融合

精製したヒトvWFとアジュバント (MPL+TDM EMULSION : RIBI社の登録商標) を等

量ずつ混和したものを、Balb/c系雄マウス（免疫開始時で8週齢）に、vWF量として一匹あたり100 μ gを皮下投与した（初回免疫）。21日後に、同様に皮下投与による免疫を行った（追加免疫）。さらに追加免疫の19日後または30日後、ヒトvWFをPBS（リン酸緩衝生理食塩水；ニッスイ製）で250 μ g/mlに希釈したものを、尾静脈より200 μ l投与した（最終免疫）。

最終免疫の3日後に脾臓をマウスから採取し、単細胞に分離した後、脾細胞をDMEM培地で洗浄した。一方、対数増殖期にあるマウス骨髓腫細胞Sp2/0-Ag14を集めDMEM培地で洗浄した。脾細胞とマウス骨髓腫細胞とを細胞数比で10:1の割合でプラスチックチューブ内で充分混合した後、50%（w/v）ポリエチレングリコール（ベーリンガー・マンハイム社製、平均分子量4000）を加え、37℃で7分間、細胞融合を行った。

遠心分離にて上澄液を除去した後、HAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを添加した10%ウシ胎仔血清を含むDMEM培地）を残渣に加え、脾細胞濃度が 5×10^6 細胞数/mlになるように懸濁した。この細胞懸濁液を96ウェルプラスチック製プレートに、1ウェルあたり100 μ l分注し、37℃、5%二酸化炭素中で培養した。2日目と5日目に、HAT培地を50 μ l/ウェル追加し、その後はハイブリドーマの増殖を見ながら3または4日ごとに半量ずつ培地交換を行った。

（2）ハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニング

本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、vWFが有する生理活性に対するモノクローナル抗体による阻害活性を指標としてスクリーニングした。ハイブリドーマの増殖が終了した各ウェルの培地を一部採取し、RIPAおよびBIPAに対する阻害活性を測定し、両方の反応を強く阻害したハイブリドーマクローンを選択した。

さらに、これらのクローンから、モルモット、ウサギ及びラットのvWFに反応性を示すモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択した。得られたハイブリドーマは、HAT培地からアミノプテリンを除いたHT培地に移してさらに培養し、限界希釈法により2回クローニングを行うことにより安定なハイブリドーマを得た。最終的に得られた2種のハイブリドーマを、AJvW-2、AJvW-4と命名した。

また、上記のRIPAおよびBIPAの反応を強く阻害したクローンから、モルモット、ウサギ及びラットのvWFに反応性を示さないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択した。得られたハイブリドーマは、HAT培地からアミノプテリンを除いたHT培地に移してさらに培養し、限界希釈法により2回クローニングを行うことにより安定なハイブリドーマを得た。最終的に得られた2種のハイブリドーマを、AJvW-1、AJvW-3と命名した。

AJvW-2及びAJvW-4は本発明の第一のモノクローナル抗体を産生し、AJvW-1及びAJvW-3は第二のモノクローナル抗体を産生する。

< 2 >モノクローナル抗体の製造と精製

(1)モノクローナル抗体の製造

生後6～8週令のBalb/c系雌マウスに2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン(商品名プリスタン、シグマ社製)0.5mlを腹腔内注射し、10～20日後に、 $1 \times 10^6 \sim 10^7$ 個のAJvW-1、AJvW-2、AJvW-3またはAJvW-4細胞をPBSに懸濁して腹腔内に接種した。7～10日後に産生された腹水を屠殺開腹したマウスより採取した。遠心分離により不溶物を取り除き、上清を回収して-20℃で保存した。

(2)モノクローナル抗体の精製

上記腹水上清より、Hi-Trap Protein-A抗体精製キット(商標、ファルマシア社製)によりIgGを精製した。すなわち、腹水2mlに溶液A(1.5M glycine、3M NaCl、pH8.9)8mlを加え、孔径45 μ mの濾過フィルター(ミリポア社製)により濾過した後、溶液Aで充分平衡化したProtein Sepharose HP(ファルマシア社製)を充填したカラム(カラムボリューム1ml)にかけ、10カラム容量の溶液Aで洗浄した。ついで10カラム容量の溶液B(0.1M glycine、pH2.8)によりIgG画分を溶出した。溶出されたIgG画分をPBSに対して透析し、これを精製標品とした。

以下、AJvW-1、AJvW-2、AJvW-3またはAJvW-4により産生されたモノクローナル抗体を、順に「抗体1」、「抗体2」、「抗体3」、「抗体4」という。

比較対照として用いるために、NMC-4を含むマウス腹水よりNMC-4を同様に精製して標品とした。

< 3 >モノクローナル抗体のサブクラスの決定

上記< 2 >で得られた精製抗体を用いて、市販のサブクラス決定キット（商標名Mono Ab-ID EIA Kit A : Zymed社製）を用いた本発明のモノクローナル抗体のIgGサブクラスを決定した。本法は、ELISA法によるものである。その結果、抗体1、抗体2、抗体3及び抗体4のいずれもIgGのクラスに属し、抗体1及び抗体3のサブクラスはIgG2aアイソタイプ、抗体2のサブクラスはIgG1アイソタイプ、抗体4のサブクラスはIgG2bアイソタイプと決定された。NMC-4は今までの報告にあるようにIgG1であった。

< 4 >本発明のモノクローナル抗体の血小板凝集阻害活性

（1）RIPAに対する阻害活性

正常ヒトのドナーから得た血液を、3.8%クエン酸ナトリウムと9 : 1で混合した後、1100rpmで10分間遠心分離して、多血小板血漿（platelet rich plasma ; PRP）を調製した。PRP（ 3×10^8 platelets/ml）225 μ lと種々の濃度のモノクローナル抗体2 μ lとを、37℃で3分間反応させた後、リストセチン（シグマ社製）を終濃度1.5mg/mlになるように加え、血小板凝集能測定装置（商標名HEMATRACER : 二光バイオサイエンス社製）を用いて血小板凝集を37℃で10分間観察した。血小板凝集活性は光透過度の変化で表し、血小板凝集阻害活性はDMEMあるいは標品を溶解した緩衝液を添加したときの最大凝集活性を対照として求めた。

結果を図1（抗体2、4）及び図2（抗体1、3）に示す。抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、及びNMC-4のいずれも、用量依存的にヒトRIPAを阻害し、そのIC₅₀値は、抗体1が0.8 μ g/ml、抗体2が3.5 μ g/ml、抗体3は1.0 μ g/ml、抗体4は2.0 μ g/ml、NMC-4は0.7 μ g/mlであった。

またモルモットPRPも同様に調製し、リストセチンを終濃度1.75mg/mlになるように加えて同様に測定した。抗体1（終濃度80 μ g/ml）、抗体3（終濃度80 μ g/ml）、及びNMC-4（終濃度27 μ g/ml）がモルモットRIPAを全く阻害しなかったのに対し、抗体2、抗体4は用量依存的にモルモットRIPAを阻害した（図3）。IC₅₀値は、抗体2が0.4 μ g/ml、抗体4は1 μ g/mlであった。

（2）BIPAに対する阻害活性

BIPA測定に先立ち、蛇毒ボトロセチンをボトロプス・ジャララカ (*Bothrops jararaca*) の粗毒 (シグマ社製) より精製した。すなわち、粗毒 1 g を 0.15 M の NaCl を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、不溶物を 3000 rpm の遠心により除去した。上清を Sephadex G-75 (5×90 cm、ファルマシア社製) を用いたゲル濾過に供し、溶出体積 480-570 ml の部分を集め、限外濾過濃縮装置 (DIAFLO YM-10: アミコン社製) を用いて 20 ml に濃縮した後、DEAE-TOYOPEARL-650M (1.6×32 cm、ファルマシア社製) を用いたイオン交換カラムに供し、0~0.3 M の NaCl 濃度勾配をかけることにより溶出した。600-640 分の溶出画分を集め、上記と同様に 4 ml に濃縮した後、さらに 0.15 M の NaCl を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) を溶媒として用いたゲル濾過カラム (Sephadex G-75、2.6×90 cm、ファルマシア社製) に供し、血小板凝集活性の強い画分を回収して、精製標品として用いた。

ヒト PRP (3×10^8 platelets/ml) 225 μ l と各濃度のモノクローナル抗体 2 μ l を 37°C で 3 分間反応させた後、上記のようにして得られたボトロセチンを終濃度 5 μ g/ml になるように加え、上記 (1) と同様の方法で血小板凝集を測定した。結果を図 4 (抗体 2、4) 及び図 5 (抗体 1、3) に示す。抗体 1、抗体 2、抗体 3、抗体 4、NMC-4 のいずれも用量依存的に BIPA を阻害し、その IC₅₀ 値は抗体 1 は 0.8 μ g/ml、抗体 2 は 2.0 μ g/ml、抗体 3 は 1.0 μ g/ml、抗体 4 は 5.6 μ g/ml、NMC-4 は 2.0 μ g/ml であった。

モルモット PRP も同様に調製し、ボトロセチンを終濃度 2 μ g/ml になるように加えて同様に測定した。抗体 1 (終濃度 80 μ g/ml)、抗体 3 (終濃度 80 μ g/ml)、NMC-4 (終濃度 27 μ g/ml) が全く BIPA を阻害しなかったのに対し、抗体 2、抗体 4 は用量依存的に BIPA を阻害した (図 6)。IC₅₀ 値は抗体 2 が 3.1 μ g/ml、抗体 4 は 3.5 μ g/ml であった。

ラットのクエン酸加血を 1300 rpm、10 分間遠心して PRP を調製した。PRP (5×10^8 platelets/ml) にボトロセチンを終濃度 0.08 μ g/ml になるように加えて同様に測定した。抗体 1 (終濃度 80 μ g/ml)、抗体 3 (終濃度 80 μ g/ml) は、ラット BIPA を全く阻害しなかったのに対し、抗体 2、抗体 4 及び NMC-4 は用量依存的に BIPA を阻害した (図 7)。IC₅₀ 値は抗体 2 が 1.2 μ g/ml、抗体 4 が 5.0 μ g/ml、NMC-4 が 2.2 μ g/ml であった。

ウサギのクエン酸加血を1200rpm、10分間遠心してPRPを調製した。PRP (3×10^8 platelets/ml) にボトロセチンを終濃度 $0.075 \mu\text{g/ml}$ になるように加えて同様に測定した。結果を図8 (抗体2、4) 及び図9 (抗体1、3) に示す。抗体1 (終濃度 $80 \mu\text{g/ml}$)、抗体3 (終濃度 $80 \mu\text{g/ml}$)、NMC-4 (終濃度 $27 \mu\text{g/ml}$) ともにウサギBIPAを全く阻害しなかったのに対し、抗体2、抗体4は用量依存的にBIPAを阻害した。IC₅₀値は抗体2が $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、抗体4が $1.8 \mu\text{g/ml}$ であった。

(3) SIPAに対する阻害活性

ヒトPRP (2.5×10^8 platelets/ml) $360 \mu\text{l}$ と各濃度のモノクローナル抗体 $40 \mu\text{l}$ を室温で10分間反応させた後、細胞機能測定装置 (東レ社製) により、ずり応力により惹起される血小板凝集を測定した。即ち、0~15秒の間は 6 dyne/cm^2 のconstant shear (定ずり応力)、15~105秒の間は $6 \rightarrow 12 \text{ dyne/cm}^2$ のlow-shear gradient (低ずり応力勾配)、105~225秒の間は $12 \rightarrow 108 \text{ dyne/cm}^2$ のhigh-shear gradient (高ずり応力勾配)、さらに350秒までの間は 108 dyne/cm^2 のconstant shear (定ずり応力) をかけた。血小板凝集活性は光透過度の変化で表し、血小板凝集阻害活性はDMEMあるいは標品を溶解している緩衝液を添加したときの最大凝集活性を対照として求めた。

結果を図10 (抗体2、4) 及び図11 (抗体1、3) に示す。抗体1、抗体2、抗体3、抗体4、NMC-4ともに用量依存的にヒトSIPAを阻害し、そのIC₅₀値は抗体1が $0.7 \mu\text{g/ml}$ 、抗体2が $1.1 \mu\text{g/ml}$ 、抗体3は $0.9 \mu\text{g/ml}$ 、抗体4は $1.5 \mu\text{g/ml}$ 、NMC-4は $1.5 \mu\text{g/ml}$ であった。

< 5 > 本発明のモノクローナル抗体のヒトvWFに対する親和性

(1) ヒトvWFの¹²⁵I標識

Iodogen (ピアス社製) 1 mg/ml 及びジクロロメタン溶液 1 ml を加え、窒素気流により溶媒を除去したポリプロピレンチューブに、ヒトvWF溶液 (0.43 mg/ml) を入れ、Na¹²⁵I溶液 (15.9 MBq) $8.6 \mu\text{l}$ を加えて室温で2分間反応させた。反応後、予め 2 ml の10%BSA (ウシ血清アルブミン) を含むTBS溶液 (Tris-buffered saline) でブロッキングし、さらに 100 ml のTBSで洗浄したPD10カラム (ファルマシア社製) に反応液を供し、TBSにより溶出した。溶出液を $500 \mu\text{l}$ ずつ分取し、溶出液のうち

2 μ l を γ カウンターにより放射活性を測定し（積算時間 1 分）、カウントの高い画分（1 ml）を ^{125}I 標識ヒト vWF（ ^{125}I -vWF）溶液（0.3 mg/ml ヒト vWF、220630 cpm/ μ l）とした。

（2）固定化血小板の調製

上記＜4＞（1）と同様にして採取したヒト PRP に、同容量の 2% パラホルムアルデヒド溶液を添加して混和した後、4℃で一晩放置した。翌日、固定化された血小板を回収し、遠心操作により PBS で 3 回洗浄後、採取時の PRP と同容量の PBS に再懸濁したものを、固定化血小板浮遊液として用いた。

（3）vWF の血小板結合性に対する本発明のモノクローナル抗体の作用

上記固定化血小板浮遊液と種々の濃度の抗体溶液、および リストセチン溶液あるいは ボトロセチン溶液を、予め 1% BSA を含む PBS でブロッキングした 96 ウェル濾過フィルタープレートに分注し、上記 ^{125}I -vWF 溶液を加え、室温、30 分間放置した。放置後、固定化血小板に結合しなかった ^{125}I -vWF を吸引濾過により除去し、0.05% Tween-20 を含む PBS でフィルターを洗浄した。フィルター上に残った ^{125}I を γ カウンターにより測定し（積算時間 1 分）、固定化血小板に対するヒト vWF の結合量を測定した。抗体非存在下での血小板へのヒト vWF 結合量に対する抗体存在下での血小板に対するヒト vWF 結合量を、結合率（%）として表した。

リストセチン存在下での結果を図 12（抗体 2、4）及び図 13（抗体 1、3）に、ボトロセチン存在下での結果を図 14（抗体 2、4）及び図 15（抗体 1、3）に示す。抗体 1、抗体 2、抗体 3、抗体 4、NMC-4 とともに リストセチンおよびボトロセチン依存的な血小板への vWF 結合を用量依存的に阻害した。リストセチン依存性反応における IC_{50} 値は、抗体 1 は 0.37 $\mu\text{g/ml}$ 、抗体 2 は 1.1 $\mu\text{g/ml}$ 、抗体 3 は 20.0 $\mu\text{g/ml}$ 、抗体 4 は 0.95 $\mu\text{g/ml}$ 、NMC-4 は 0.35 $\mu\text{g/ml}$ であった。ボトロセチン依存性反応における IC_{50} 値は抗体 1 は 1.2 $\mu\text{g/ml}$ 、抗体 2 は 0.9 $\mu\text{g/ml}$ 、抗体 3 は 2.1 $\mu\text{g/ml}$ 、抗体 4 は 0.9 $\mu\text{g/ml}$ 、NMC-4 は 0.3 $\mu\text{g/ml}$ であった。

＜6＞抗体 1、抗体 2、抗体 3、抗体 4 と NMC-4 のエピトープの比較

抗体 1、抗体 2、抗体 3、抗体 4 のエピトープと NMC-4 のエピトープを比較する

ために、NMC-4の固相化ヒトvWFへの結合に対する抗体1、抗体2、抗体3及び抗体4の阻害効果を調べた。

精製した抗体1、抗体2、抗体3、抗体4及びNMC-4を、ビオチン化キット (Biotinylation kit: アマシャム社の商標) を用いてビオチン化し、ビオチン化抗体1、ビオチン化抗体2、ビオチン化抗体3、ビオチン化抗体4、及びビオチン化NMC-4の各標品を作製した。すなわちPBS溶液に対して透析した各モノクローナル抗体溶液に、ビオチン-スパーサー アーム-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (biotin-spacer arm-N-hydroxysuccinimide ester) 溶液を添加して室温で1時間反応させ、Sephadex G25 (ファルマシア社製) カラムにより精製した。

PBS溶液に溶解したヒトvWF (5 μ g/ml) を50 μ lずつEIA用マイクロタイタープレート (E. I. A Microtitration plate: Linbro/Titertek社製) のウェルに添加し、4℃で一晩放置することによりヒトvWFを固相化した。翌日、洗浄液 (0.05% Tween 20を含んだPBS) でウェルを3回洗浄後、0.5%BSAを含むPBS溶液を添加して室温、1.5時間放置することにより蛋白非吸着部分をブロックした。

エッペンドルフチューブ内で各ビオチン化抗体と種々の濃度のビオチン化していない抗体1、抗体2、抗体3、抗体4またはNMC-4を混合した後、上記ヒトvWF固相化ウェルに50 μ lずつ添加し、37℃で1時間インキュベートした。ウェルを洗浄後、0.05% Tween 20および1% BSAを含む0.05M TBSで500倍に希釈したストレプトアビジン結合アルカリホスファターゼ (streptavidin-alkaline phosphatase: Amersham社製) を50 μ lずつ添加し、37℃で1時間反応させた。

ウェルを洗浄した後、発色基質p-ニトロフェニルフォスフェート (p-nitrophenyl phosphate: Sigma社製) を100 μ lずつ加えて20分間静置した。405nmの吸光度により、ヒトvWFに結合したビオチン化抗体を測定した。非特異的結合は、過剰量 (100倍) の非ビオチン化抗体存在下で同様に測定し、上記の実測値からこの値を差し引いた値を特異的吸光度とした。

結果を図16～20に示す。抗体1、抗体2、抗体3及び抗体4は、ビオチン化NMC-4の固相化vWFに対する結合を全く阻害しなかったが、ビオチン化抗体1、ビオチン化抗体2、ビオチン化抗体3及びビオチン化抗体4の固相化vWFに対する結合を互いに阻害した。一方、NMC-4は、ビオチン化抗体1、ビオチン化抗体2、

ビオチン化抗体 3 及びビオチン化抗体 4 の固相化vWFに対する結合を全く阻害しなかった。以上の結果は、抗体 1、抗体 2、抗体 3 及び抗体 4 のエピトープは互いにvWF上の近傍に存在するが、NMC-4のエピトープとは異なっていることを示す。

< 7 > モルモットにおける (ex vivo) 血小板凝集抑制効果

前記< 2 >において精製した抗体 2 および抗体 4 をPBSで各種濃度に調製し、モルモット（雌、430～600g）に100 μ g/kg、あるいは300 μ g/kgの用量で静脈注射した（一群4匹）。プラセボ・コントロールにはPBSを用いた。5分後にエーテル麻酔下にて、腹部大動脈よりクエン酸採血を行い、PRP（血小板数 3.0×10^8 platelets/ml）を調製して< 4 >と同様の方法でRIPAまたはBIPAを測定した。PBS投与群における最大凝集率を100%とした時の各抗体の凝集阻害率を算出した。

結果を図 2 1、2 2 に示す。抗体 2、抗体 4 は用量依存的にRIPAを阻害し、ED₅₀値（50%凝集阻害値）は抗体 2 が70 μ g/kg、抗体 4 は90 μ g/kgであった。またBIPAにおける抗体 4 のED₅₀値は55 μ g/kgであった。この抗体 2 及び抗体 4 の強いRIPA、BIPA阻害作用は投与 6 時間後まで持続して観察され、4 8 時間後には消滅した。

上記試験とは別に、抗体投与 5 分後のクエン酸採血した全血中の血液学的パラメーターを自動血球測定装置（Sysmex E-2000、東亜医用電子社製）を用いて測定した。抗体 2 あるいは抗体 4 を、100 μ g/kg、300 μ g/kgのいずれの投与量で投与した場合においても、血小板数、赤血球数、白血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、赤血球分布幅、血小板分布幅、平均血小板容積、大型白血球比率、血小板クリット値に大きな変動は認められなかった。

さらに上記と同様に抗体投与 5 分後の血液より遠心操作により血漿を分離し、凝固系パラメーター測定装置（Sysmex CA-3000、東亜医用電子社製）を用いて活性化部分トロンボプラスチン時間、プロトロンビン時間、フィブリンノーゲン濃度を測定したところ、抗体 2 あるいは抗体 4 を1000 μ g/kgの投与量で投与した場合においても各パラメーターに大きな変動はみられなかった。

< 8 > モルモットにおける本発明のモノクローナル抗体の血栓予防効果 (in viv

o)

(1) 光増感反応惹起モルモット頸動脈血栓モデル (PITモデル) における血栓予防効果の評価

中島らの方法 (Thrombosis research第67巻第435頁1992年) に従い、モルモット頸動脈において閉塞性血栓を形成させ、抗体2または抗体4の投与下あるいは非投与下での血栓が形成されるまでの時間を測定した。

ウレタン麻酔下にモルモット頸動脈を露出、剥離してパルスドップラー血流計プローベを装着した。頸静脈に付置したカニューレより30、100、もしくは300 μ g/kgの抗体2または抗体4、あるいは生理食塩水を投与した。その5分後に同カニューレより光増感物質ローズベンガルを10 mg/kg投与すると同時に、プローベ装着部位より上流 (心臓側) の血管に血栓作製光源 (浜松ホトニクス社製) を用いて540nm緑色励起光を照射し、血栓形成により血管が閉塞し血流停止するまでの時間 (閉塞時間) を測定した。

結果を図23、24に示す。抗体2及び抗体4は100 μ g/kg以上の投与量において閉塞時間を有意に延長した。統計処理は、Mann-Whitney U testにより行なった。図中、*は $p < 0.05$ を、**は $p < 0.01$ を示す。

(2) A-Vシャントモデルによる血栓予防効果の評価

ウレタン麻酔下でモルモット左頸静脈にポリエチレンチューブを挿入し、30、100、もしくは300 μ g/kgの抗体2、あるいは生理食塩水を投与した。その5分後、チューブ反対側を右頸動脈に挿入してシャントを形成し、血流を再開通させた。パルスドップラー血流計を用いて、血流停止までの時間 (閉塞時間) を測定した。

結果を図25に示す。抗体2は100 μ g/kg以上の投与量において閉塞時間を有意に延長した。統計処理はMann-Whitney U testにより行なった。図中、*は $p < 0.05$ を、**は $p < 0.01$ を示す。

(3) 出血時間の測定による

ペントバルビタール麻酔下でモルモットに100もしくは300 μ g/kgの抗体2または抗体4、あるいは生理食塩水を静脈内投与した。その5分後に足底動脈を長さ5mmにわたって切開し、傷口からの出血の有無を濾紙に付着する血液痕を指標に1

5秒ごとに確認した。切開から出血停止までに要する時間を測定した。

結果を図26、27に示す。抗体2及び抗体4は、1000 μ g/kgで出血時間を延長した。上記PITモデル、A-Vシャントモデルで閉塞時間延長効果を示した300 μ g/kgの投与量では、出血時間には全く影響を与えなかった。統計処理はMann-Whitney U testにより行なった。図中、*は $p<0.05$ を、**は $p<0.01$ を示す。

以上の実験結果より、抗体2及び抗体4ともに、生体内に投与した場合に、臨床で問題となる出血傾向を示すことなく、強い血栓形成阻害作用を発揮することが示された。

産業上の利用性

本発明により得られるモノクローナル抗体は、vWFに対する強い親和性と高い反応特異性を有しており、従来知られていたvWFに対するモノクローナル抗体とは異なるエピトープを有するものであり、抗血栓剤の有効成分として使用することができる。本発明の抗血栓剤は、vWFが関与する疾患（血栓性疾患、不安定狭心症、その他）の非常に効果的な予防薬および治療薬として使用できることが期待される。また、本発明のモノクローナル抗体は、vWFのGPIIb結合部位に関するきわめて有用な情報を提供することが出来る。

さらに、本発明の第一のモノクローナル抗体は、モルモットvWFに対して反応性を有しているので、モルモットを用いた生理活性試験や副作用試験等を行うことが可能となる。

請求の範囲

1. ヒト・フォンビルブランド因子に対して反応性を有し、ヒト血小板のRIPA（リストセチン惹起血小板凝集反応）、BIPA（ボトロセチン惹起血小板凝集反応）、及びSIPA（高ずり応力により惹起される血小板凝集反応）を阻害する作用を有し、かつ、抗血栓作用を発揮する薬効量において出血作用を示さないモノクローナル抗体を有効成分として含有する抗血栓剤。

2. 前記モノクローナル抗体が、ヒト・フォンビルブランド因子で免疫されたマウスの脾細胞とマウス骨髓腫細胞との融合によって形成されたハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体である請求項1記載の抗血栓剤。

3. 前記ハイブリドーマが、AJvW-1、AJvW-2、AJvW-3もしくはAJvW-4、またはこれらのいずれかの変種である請求項2記載の抗血栓剤。

4. 下記性質を有するモノクローナル抗体。

(a) ヒト・フォンビルブランド因子に対して反応性を有する。

(b) ヒト血小板のRIPA（リストセチン惹起血小板凝集反応）、BIPA（ボトロセチン惹起血小板凝集反応）、及びSIPA（高ずり応力により惹起される血小板凝集反応）を阻害する。

(c) モルモット血小板のRIPA（リストセチン惹起血小板凝集反応）及びBIPA（ボトロセチン惹起血小板凝集反応）を阻害する。

(d) モルモット生体内で強い抗血栓作用を示すが、出血は引き起こさない。

5. ヒト・フォンビルブランド因子で免疫されたマウスの脾細胞とマウス骨髓腫細胞との融合によって形成されたハイブリドーマにより産生される請求項4記載のモノクローナル抗体。

6. 前記ハイブリドーマがAJvW-2もしくはAJvW-4またはこれらのいずれかの変種である請求項5記載のモノクローナル抗体。

7. 下記性質を有するモノクローナル抗体。

(i) ヒト・フォンビルブランド因子に対して反応特異性を有する。

(ii) ヒト血小板のRIPA（リストセチン惹起血小板凝集反応）、BIPA（ボトロセチン惹起血小板凝集反応）、及びSIPA（高ずり応力により惹起される血小板凝集反

応)を阻害する。

(ハ) ラット、モルモット、及びウサギのフォンビルブランド因子とは反応しない。

8. ヒト・フォンビルブランド因子で免疫されたマウスの脾細胞とマウス骨髓腫細胞との融合によって形成されたハイブリドーマにより産生される請求項7記載のモノクローナル抗体。

9. 前記ハイブリドーマがAJvW-1もしくはAJvW-3またはこれらのいずれか変種である請求項8記載のモノクローナル抗体。

10. ヒトvWF因子に対して反応性を有するモノクローナル抗体であって、請求項6または9に記載のモノクローナル抗体と共存させたときに、これらのモノクローナル抗体とvWF因子との結合を阻害する作用を有するモノクローナル抗体。

11. フォンビルブランド因子で免疫されたマウスの脾細胞とSp2/0-Ag14マウス骨髓腫細胞との融合によって形成され、請求項5記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

12. AJvW-2もしくはAJvW-4又はこれらのいずれかの変種である請求項11記載のハイブリドーマ。

13. フォンビルブランド因子で免疫されたマウスの脾細胞とSp2/0-Ag14マウス骨髓腫細胞との融合によって形成され、請求項8記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

14. AJvW-1もしくはAJvW-3又はこれらのいずれかの変種である請求項13記載のハイブリドーマ。

1 / 14

図 1

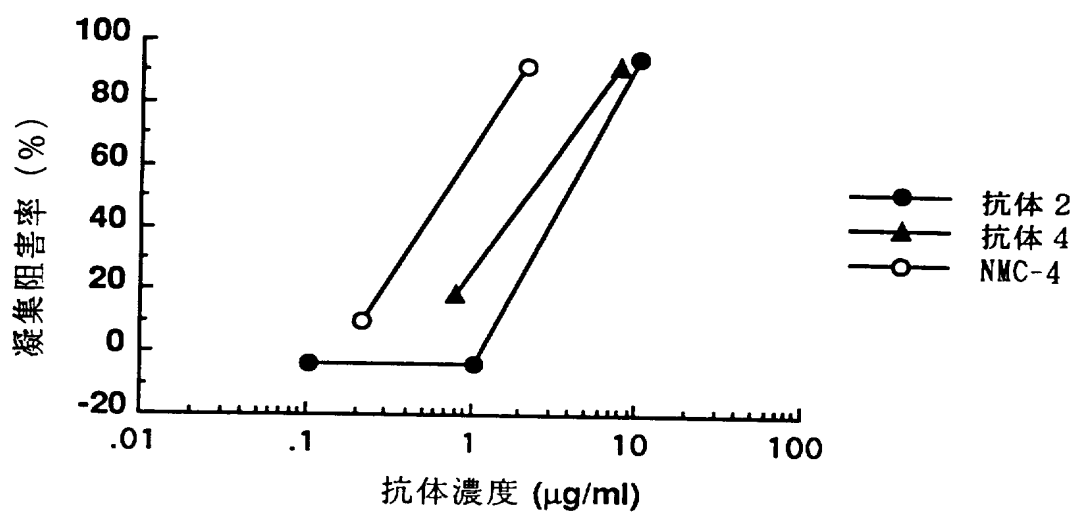
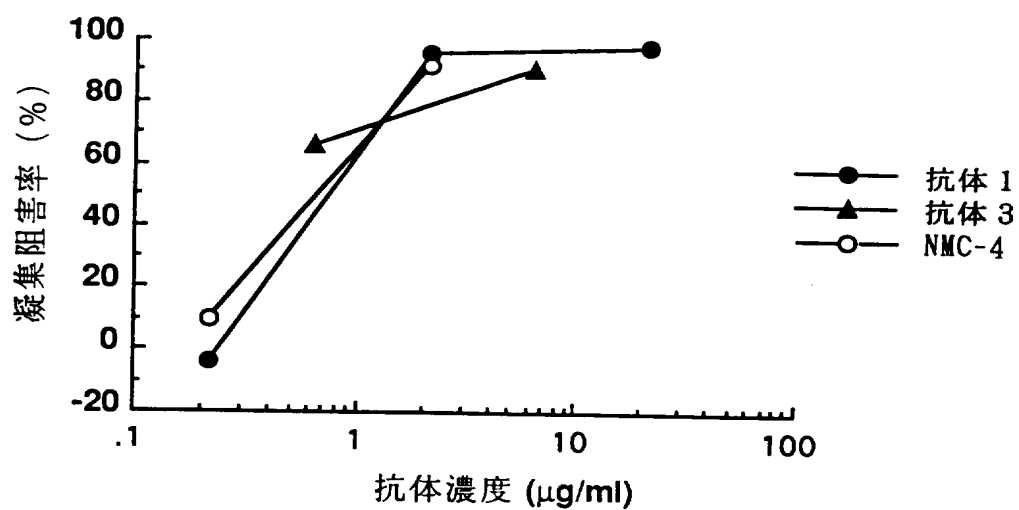


図 2



2 / 14

図 3

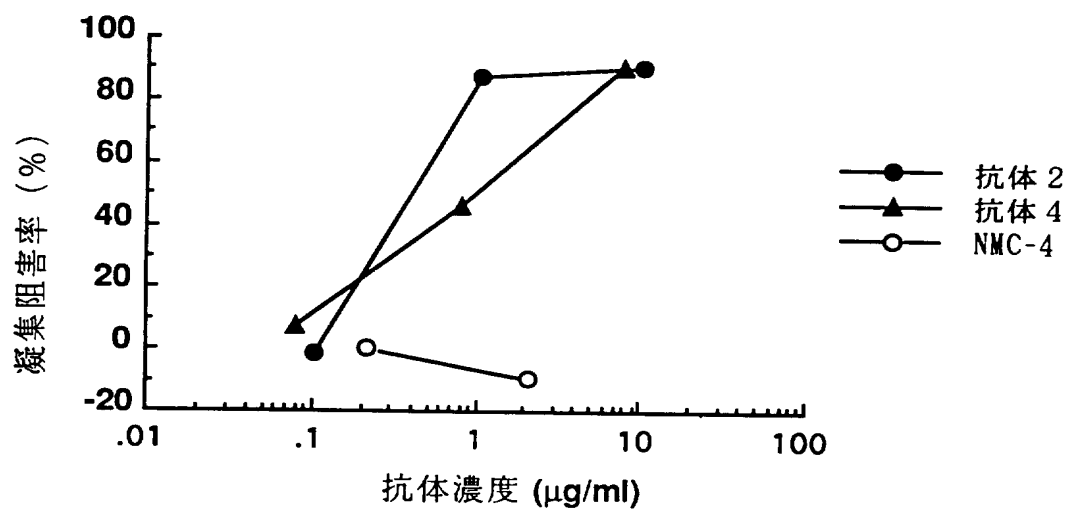
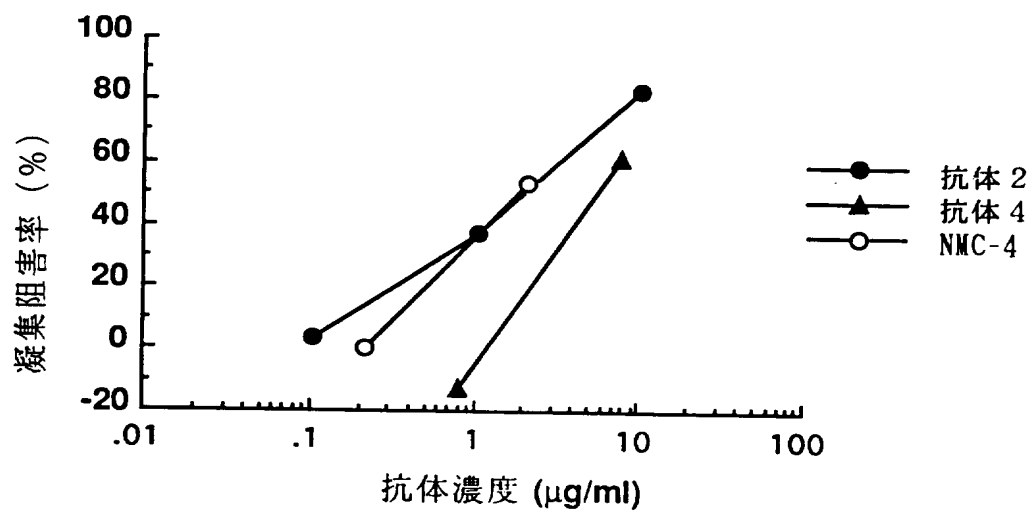


図 4



3 / 14

図 5

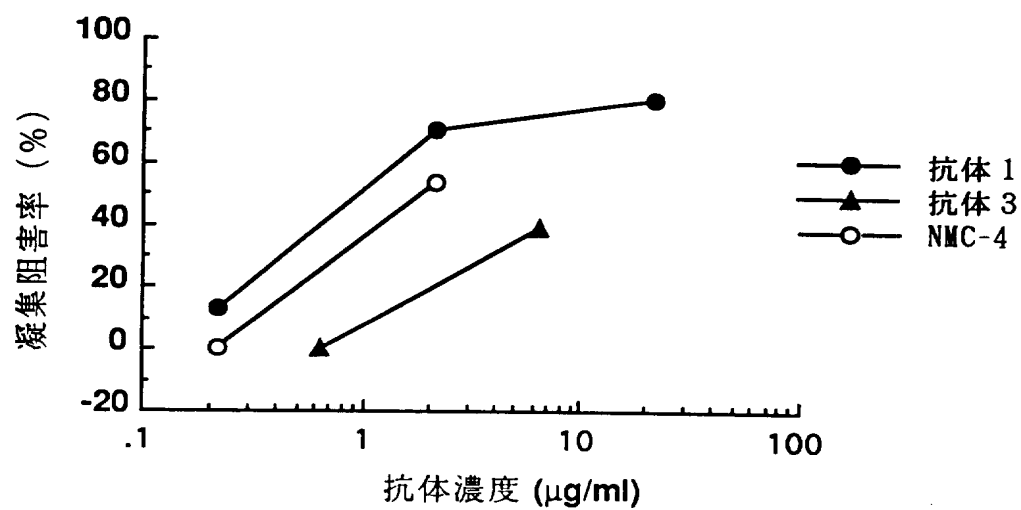
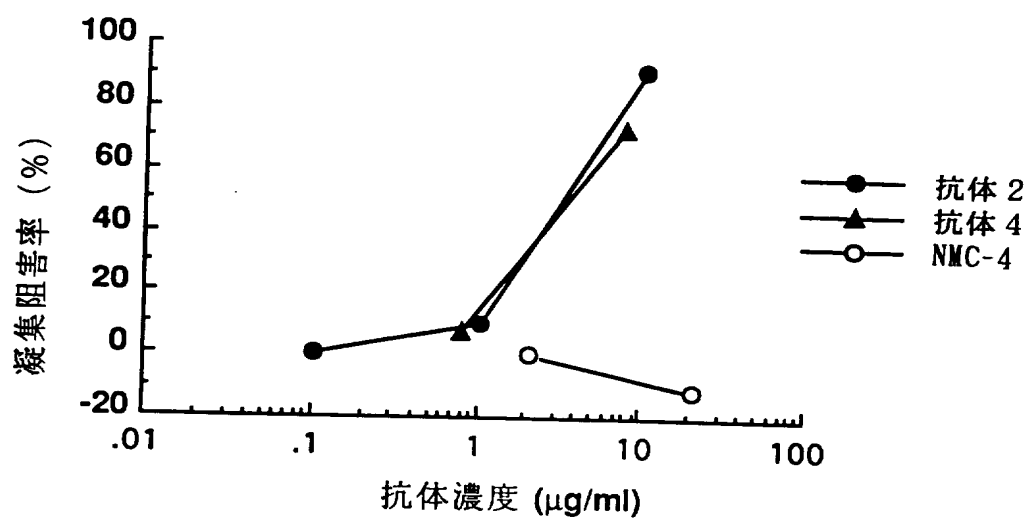


図 6



4 / 14

図 7

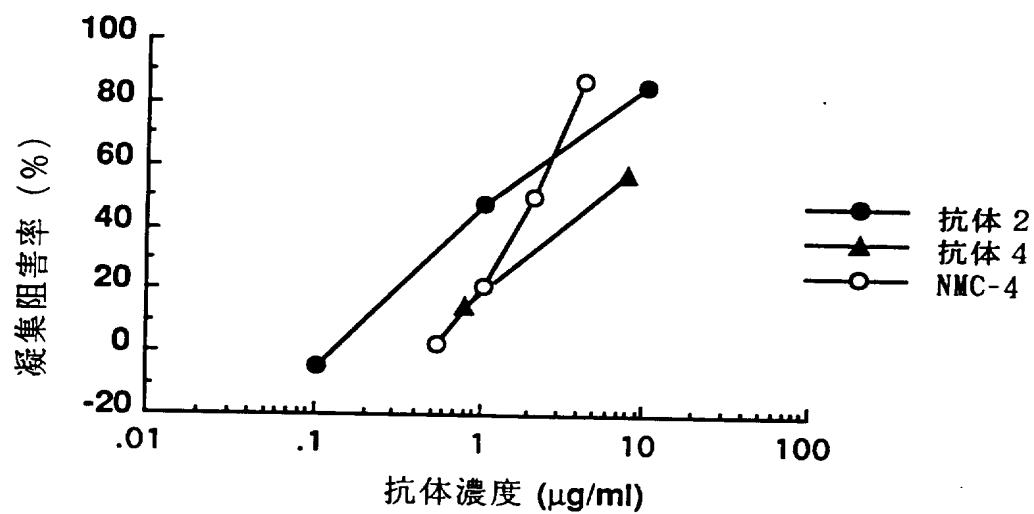
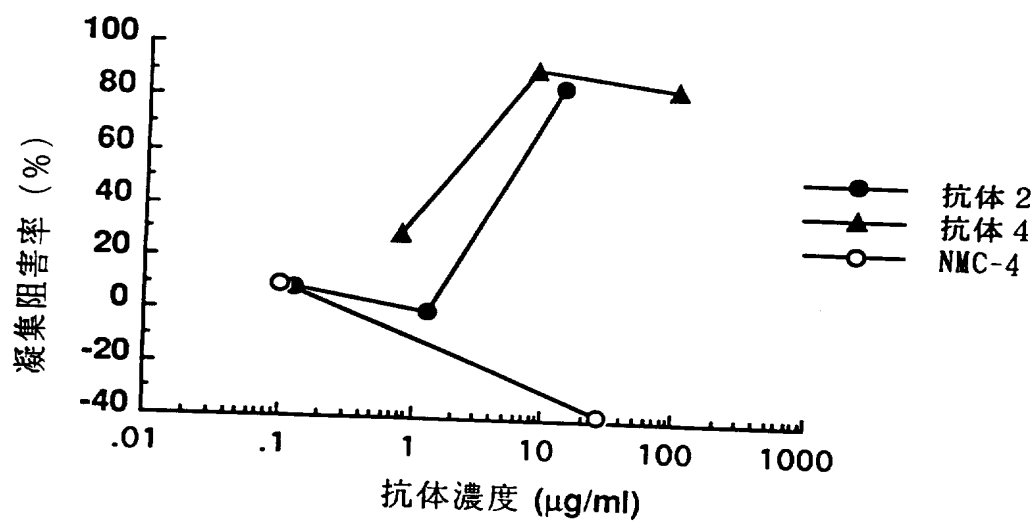


図 8



5 / 14

図 9

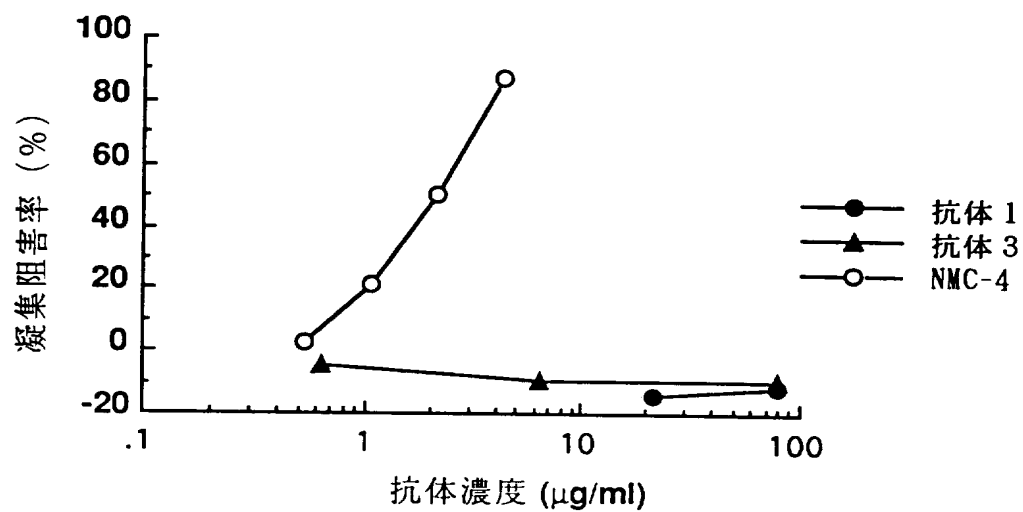
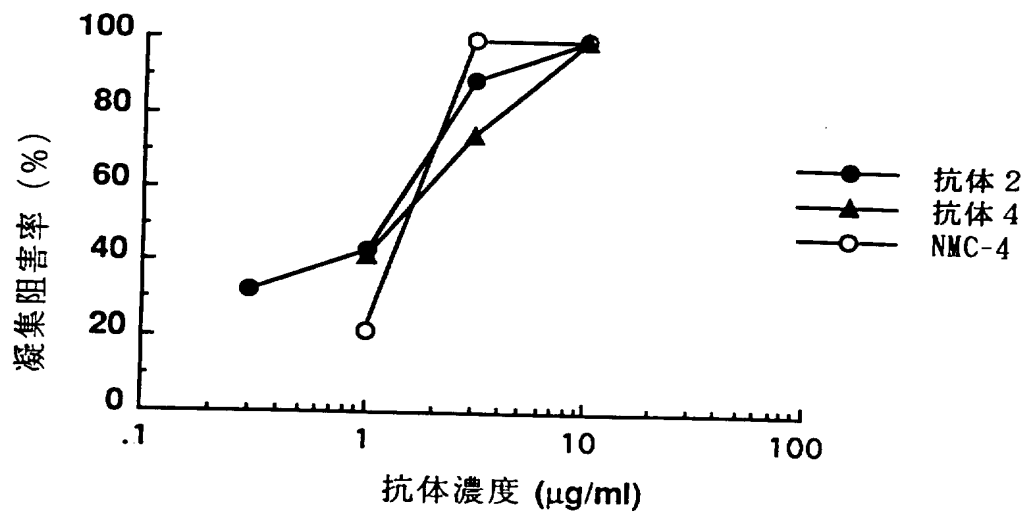


図 10



6 / 14

図 1 1

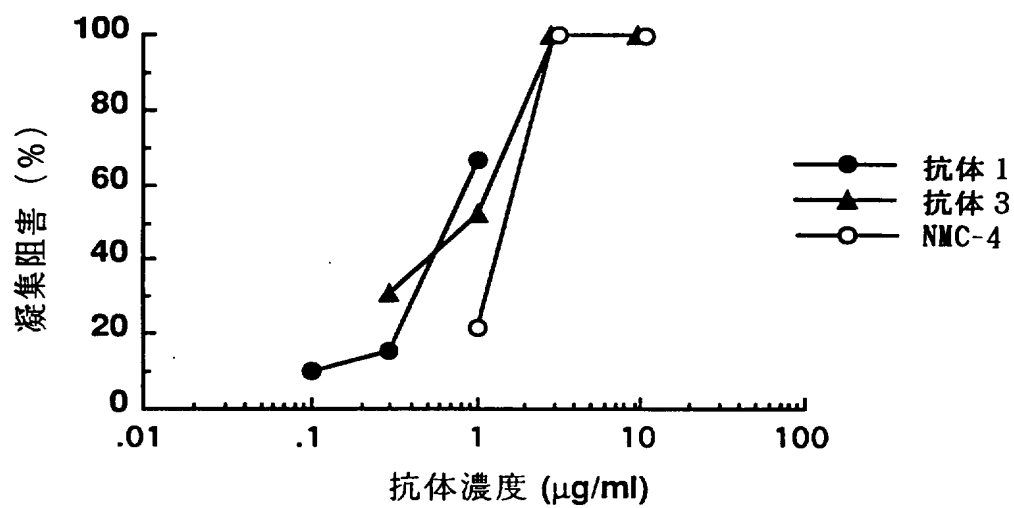
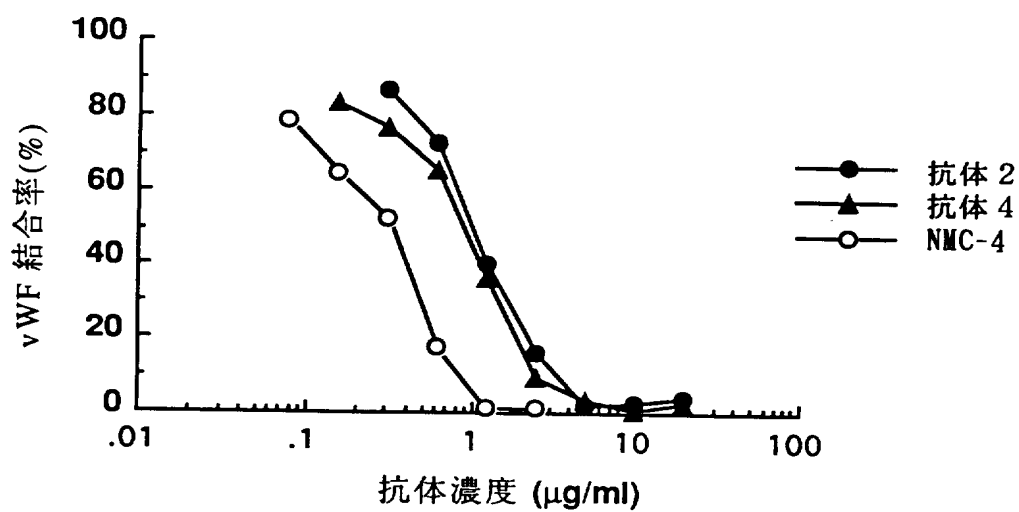


図 1 2



7 / 14

図 13

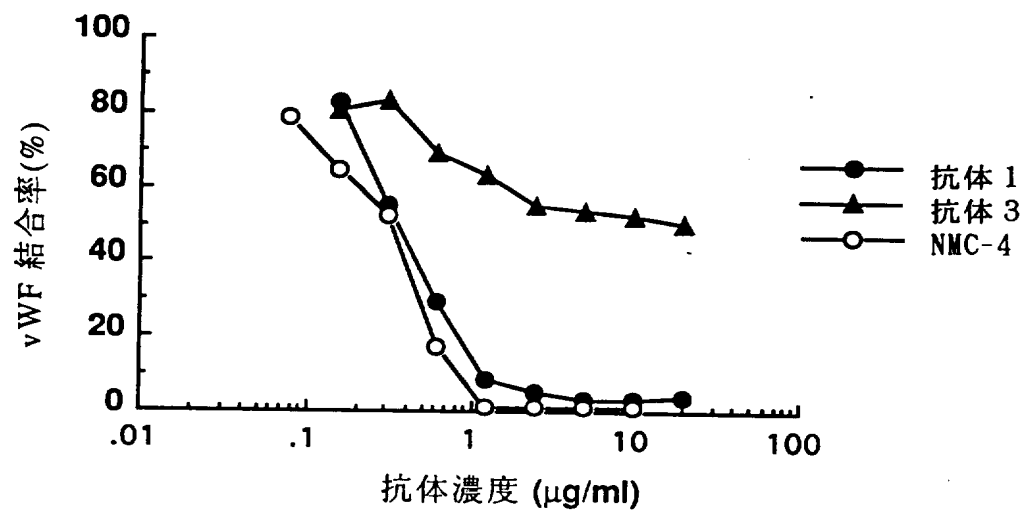
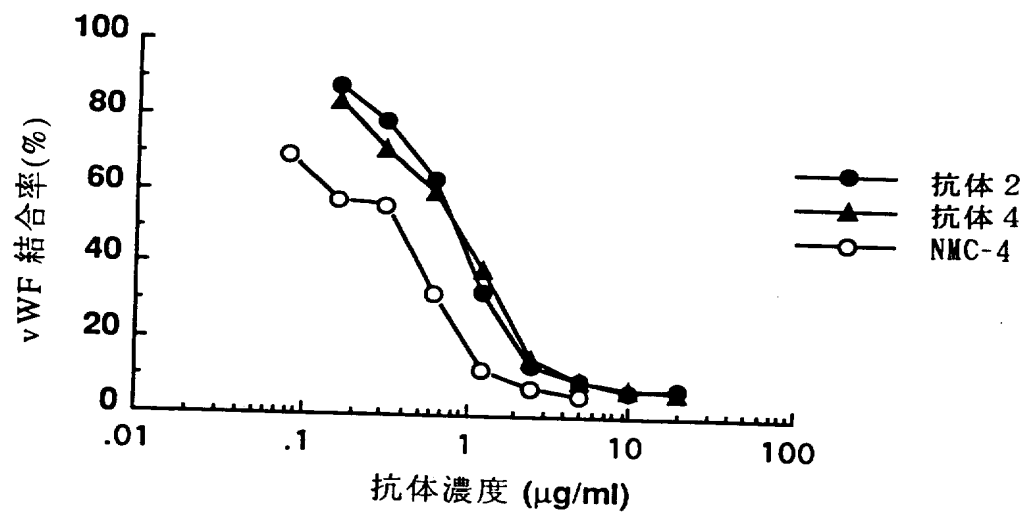


図 14



8 / 14

図 15

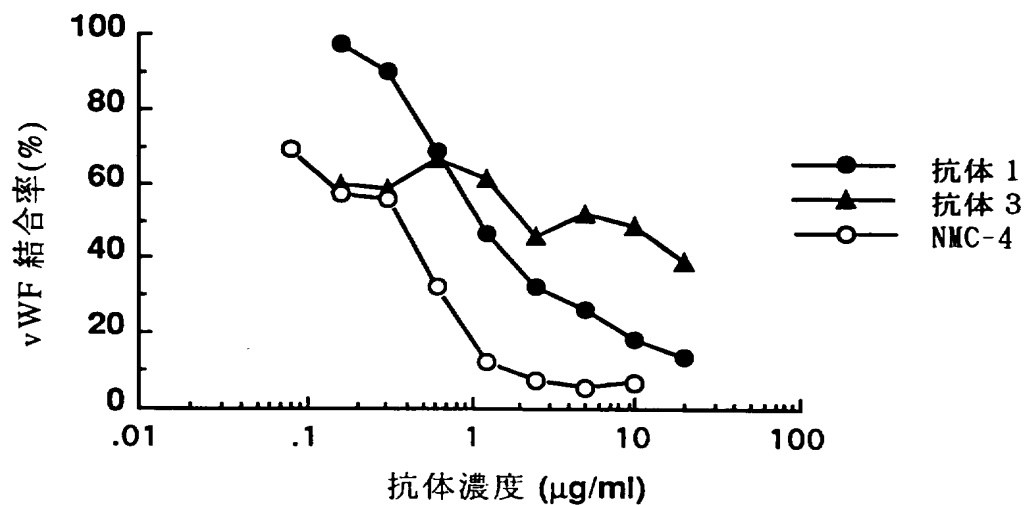


図 16 biotin-AJvW-1の固相化vWFへの結合に対する各抗体の効果

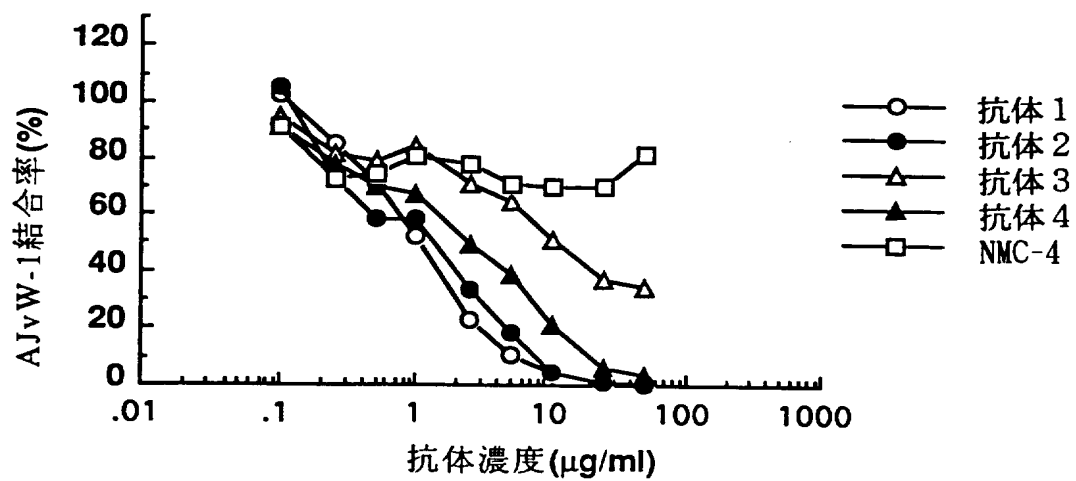


図 17 biotin-AJvW-2の固相化vWFへの結合に対する各抗体の効果

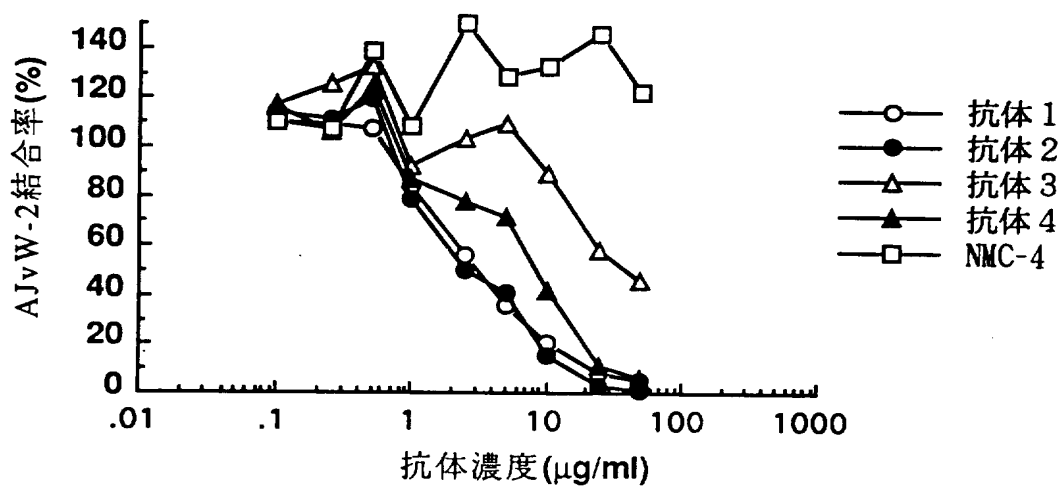
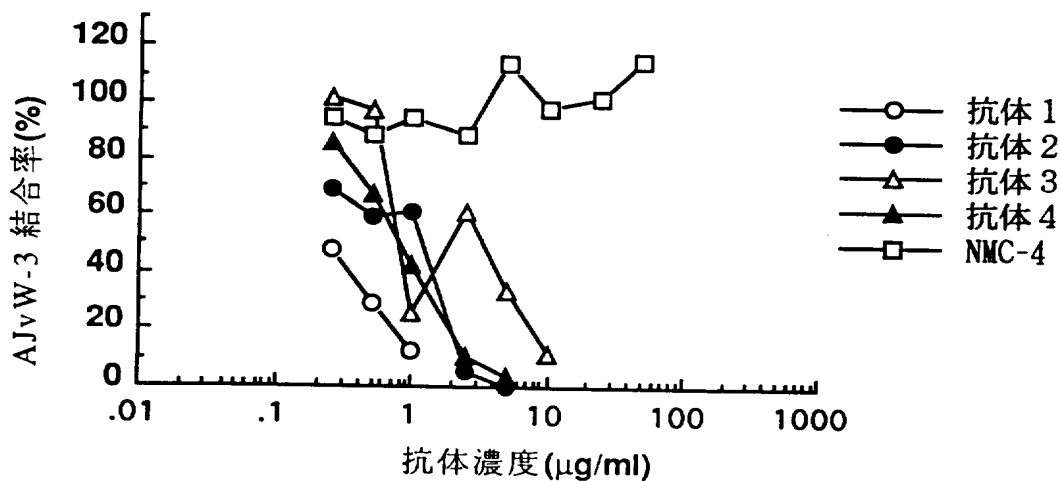


図 18 biotin-AJvW-3の固相化vWFへの結合に対する各抗体の効果



10 / 14

図 19 biotin-AJvW-4の固相化vWFへの結合に対する各抗体の効果

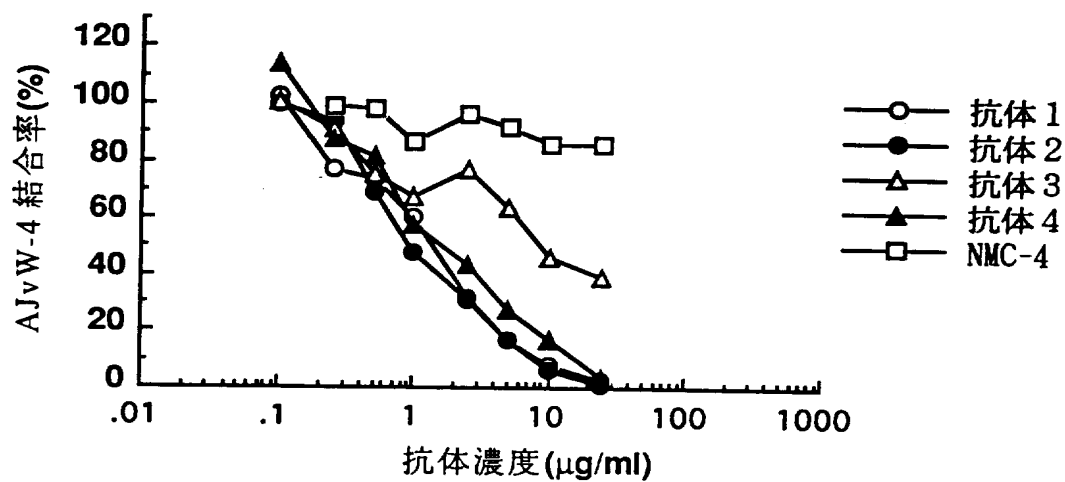
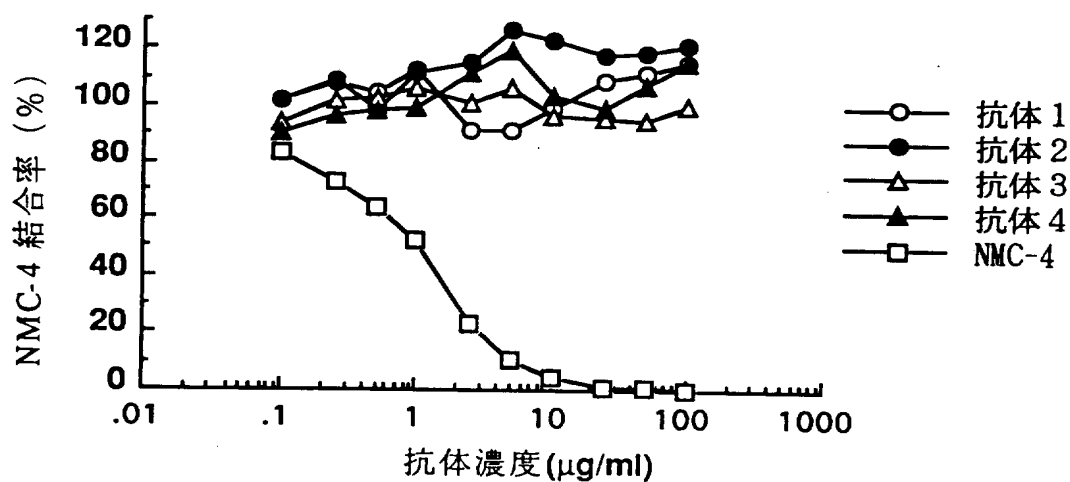


図 20 biotin-NMC-4 の固相化vWF への結合に対する各抗体の効果



11 / 14

図 2 1

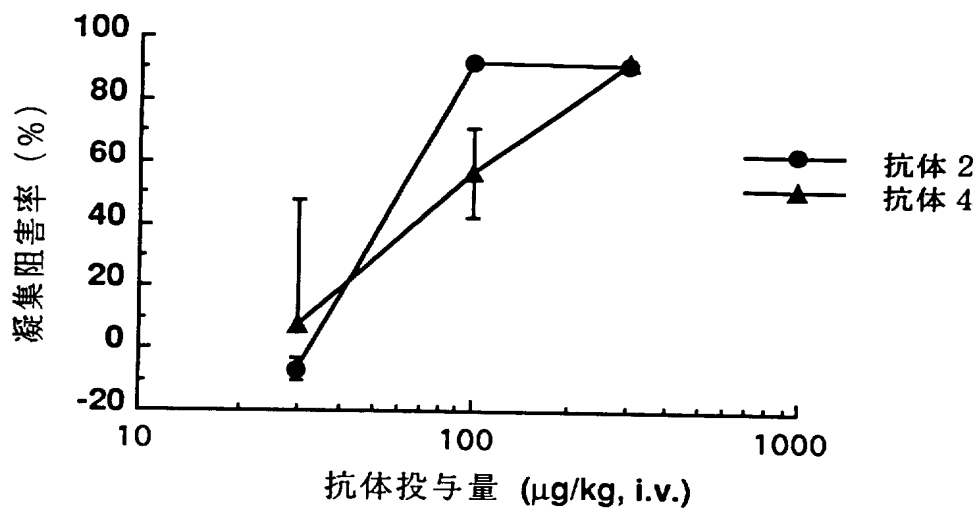
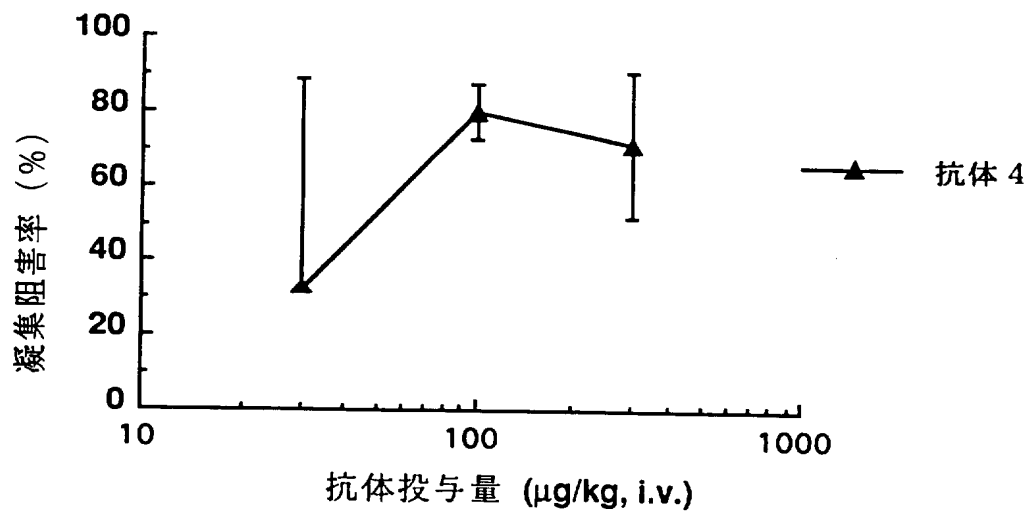


図 2 2



12 / 14

図 23

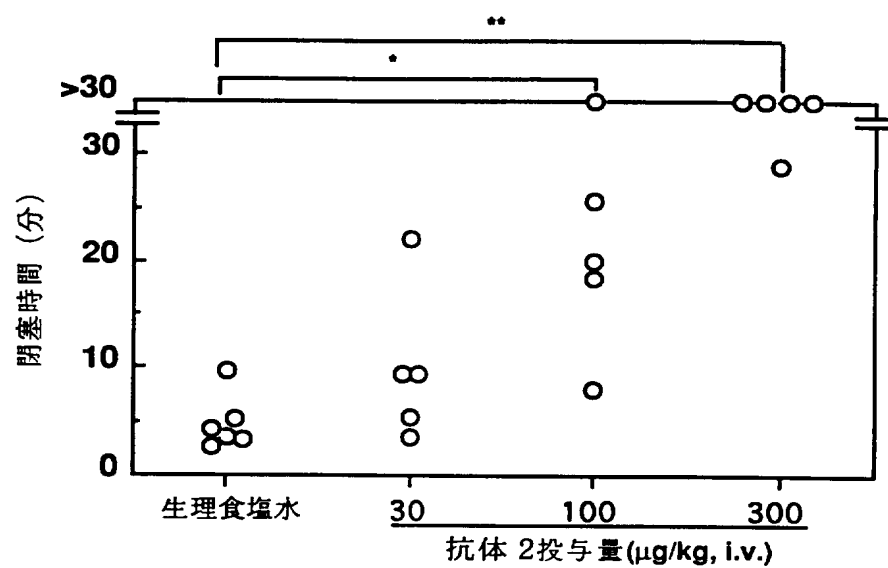
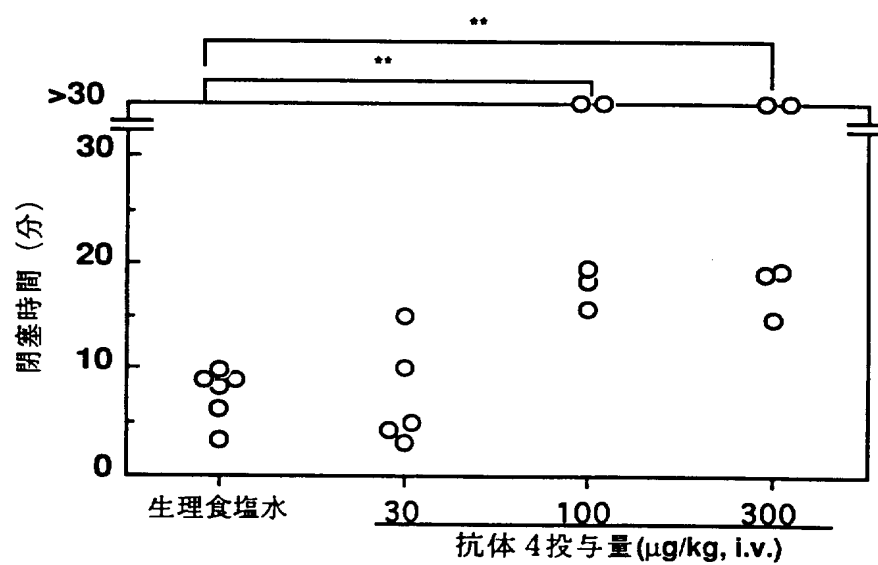


図 24



13 / 14

図 2 5

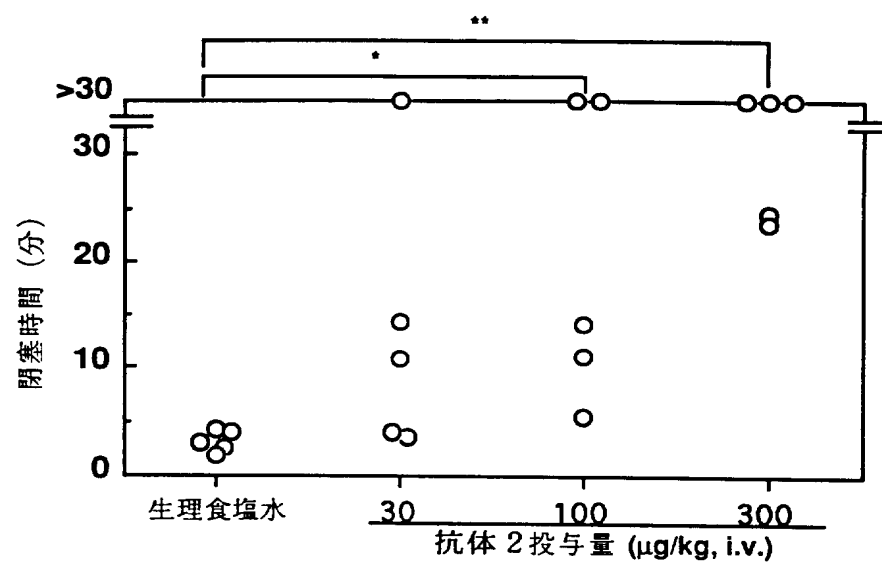
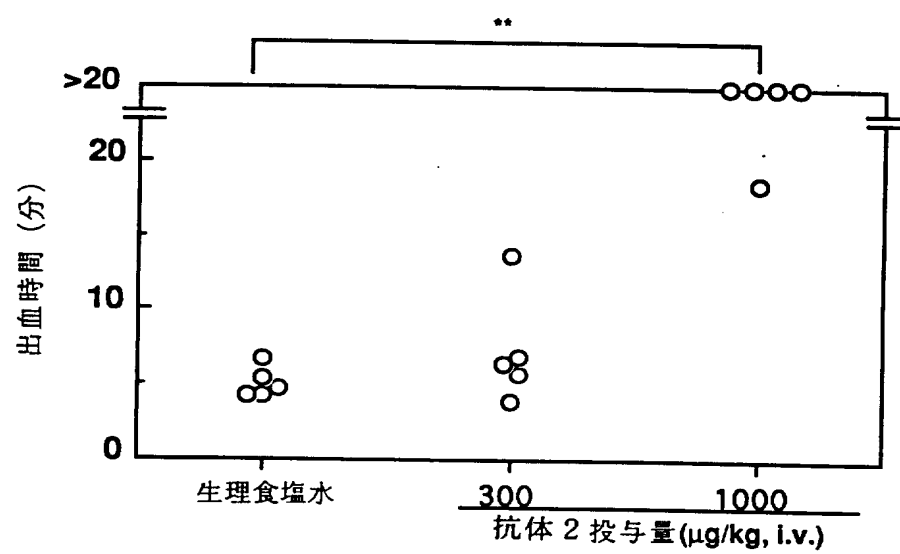
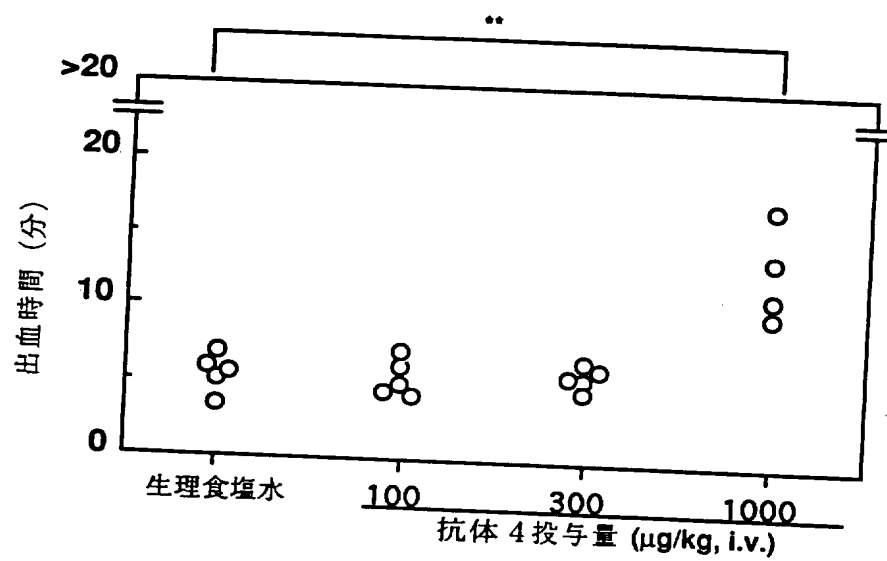


図 2 6



14 / 14

図 27



出願人又は代理人の書類記号	国際出願番号
B-2180P405	PCT/JP95/02435

寄託された微生物に関する表示
(PCT規則13の2)

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。

1 2 頁、 5 ~ 1 1 行

B. 寄託の表示

他の寄託が別紙に記載されている ☒

寄託機関の名称

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所
National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency of Industrial Science and Technology

寄託機関のあて名 (郵便番号及び国名を含む)

〒305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN

寄託の日付

2 4 . 0 8 . 9 4

受託番号

F E R M B P - 5 2 4 9

C. 追加の表示 (該当しない場合には記載しない)

この情報は別紙に続いている ☐

ヨーロッパ特許条約施行規則28(4)に基づき、本微生物に係る試料分譲を請求人より推薦された専門家にのみ為されることを希望する。

In accordance with Rule 28(4) EPC, the applicant hereby requests that a sample of the microorganism is to be made available only an expert approved by the applicant.

D. この表示を行うための指定国 (すべての指定国のために行わない場合)

E P 特許で指定される特許協力条約締約国の全ての指定国
All designating states of the European Patent Convention under the PCT.

E. 追加事項の表示の届出 (該当しない場合には記載しない)

下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。(例えば「受託番号」のように表示事項を明記する)

受理官庁記入欄

☐ この用紙は国際出願とともに受理した

権限のある職員

加 藤 賢二

国際事務局記入欄

☐ この用紙が国際事務局に受理された日

権限のある職員

出願人又は代理人の書類記号 B-2180P405	国際出願番号 PCT/JP95/02435
-----------------------------	--------------------------

寄託された微生物に関する表示
(PCT規則13の2)

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。

1 2 頁、 5 ~ 1 1 行

B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている ☒

寄託機関の名称 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所
National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency of Industrial Science and Technology

寄託機関のあて名 (郵便番号及び国名を含む)

〒305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN

寄託の日付 2 4 . 0 8 . 9 4	受託番号 F E R M B P - 5 2 4 7
--------------------------	-------------------------------

C. 追加の表示 (該当しない場合には記載しない) この情報は別紙に続いている ☐

ヨーロッパ特許条約施行規則28(4)に基づき、本微生物に係る試料分譲を請求人より推薦された専門家にのみ為されることを希望する。

In accordance with Rule 28(4) EPC, the applicant hereby requests that a sample of the microorganism is to be made available only an expert approved by the applicant.

D. この表示を行うための指定国 (すべての指定国のために行わない場合)

E P 特許で指定される特許協力条約締約国の全ての指定国
All designating states of the European Patent Convention under the PCT.

E. 追加事項の表示の届出 (該当しない場合には記載しない)

下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。(例えば「受託番号」のように表示事項を明記する)

受理官庁記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 加 藤 賢 二

国際事務局記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 0 8 MARCH 1995 (0 6. 03. 96)
権限のある職員 Y HAMANO

出願人又は代理人の書類記号 B-2180P405	国際出願番号 PCT/JP95/02435
-----------------------------	--------------------------

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。

1 2 頁、 5 ~ 1 1 行

B. 寄託の表示

他の寄託が別紙に記載されている ☒

寄託機関の名称

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所
National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency of Industrial Science and Technology

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

〒305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN

寄託の日付

2 4 . 0 8 . 9 4

受託番号

F E R M B P - 5 2 4 8

C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない）

この情報は別紙に続いている ☐

ヨーロッパ特許条約施行規則28(4)に基づき、本微生物に係る試料分譲を請求人より推薦された専門家にのみ為されることを希望する。

In accordance with Rule 28(4) EPC, the applicant hereby requests that a sample of the microorganism is to be made available only an expert approved by the applicant.

D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

E P 特許で指定される特許協力条約締約国の全ての指定国
All designating states of the European Patent Convention under the PCT.

E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）

受理官庁記入欄

☐ この用紙は国際出願とともに受理した

権限のある職員

加 藤 賢二

国際事務局記入欄

☐ この用紙が国際事務局に受理された日

権限のある職員

出願人又は代理人の書類記号 B-2180P405	国際出願番号 PCT/JP95/02435
-----------------------------	--------------------------

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。 <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> 1 2 頁、 5 ~ 1 1 行 </div>	
B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている <input checked="" type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 <div style="text-align: center;"> 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology </div>	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） <div style="text-align: center;"> 〒305 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN </div>	
寄託の日付 2 4 . 0 8 . 9 4	受託番号 F E R M B P - 5 2 5 0
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>	
<p>ヨーロッパ特許条約施行規則28（4）に基づき、本微生物に係る試料分譲を請求人より推薦された専門家にのみ為されることを希望する。</p> <p>In accordance with Rule 28(4) EPC, the applicant hereby requests that a sample of the microorganism is to be made available only an expert approved by the applicant.</p>	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）	
<div style="text-align: center;"> E P 特許で指定される特許協力条約締約国の全ての指定国 All designating states of the European Patent Convention under the PCT. </div>	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）	
下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

受理官庁記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 <div style="text-align: center;">加 藤 賢 二</div>

国際事務局記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日
権限のある職員

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/02435

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12P21/08, C12N5/20, C07K16/36 // A61K39/395, (C12P21/08, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12P21/08, C12N5/20, C07K16/36 // A61K39/395, (C12P21/08, C12R1:91)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P	Yamamoto H et al. "Monoclonal Antibody Against von Willebrand Factor Inhibits Thrombus Formation Without Prolongation of Breeding time", Blood, (1995), 10 suppl.1, p.84A	1-9, 11-14 10
A	Fujiyama Y et al. "The Interaction of Botrocetin with normal or Variant von Willebrand Factor Types IIA and IIB and its Inhibition by Monoclonal Antibodies that block Receptor Binding", Thromb. Haemostasis, (1992), Vol. 68, No. 4, p. 464-469	1-9, 11-14 10
A	Fujimura Y et al. "Studies on Anti-von Willebrand Factor vWF Monoclonal Antibody NMC-4 Which Inhibits Both Ristocetin-Induced and Botrocetin-Induced vWF Binding to Platelet Glycoprotein IB", Blood, (1991), Vol. 77, No. 1, p. 113-120	1-9, 11-14 10
A	Pletu G. et al. "Production in Escherichia-coli of a Biologically Active Subfragment of von	1-9, 11-14 10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
February 27, 1996 (27. 02. 96)Date of mailing of the international search report
March 26, 1996 (26. 03. 96)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/02435

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Willebrand Factor Corresponding to the Platelet Glycoprotein IB Collagen and Heparin Binding Domains", Biochem, Biophys. Res. Commn., (1989) Vol. 164, No. 3, p. 1339-1347	
A	Aihara M et al. "Glycoprotein IB Has a Partial Role in Platelet-von Willebrand Factor Collagen Interaction", Thromb. Haemostasis, (1988), Vol. 60, No. 2, p. 182-187	1-9, 11-14 10
A	Jorieux et al. "Characterization of a Monoclonal Antibody to von Willebrand Factor as a Potent Inhibitor of Ristocetin-Mediated Platelet Interaction and Platelet Adhesion", Thromb. Haemostasis, (1987), Vol. 57, No. 3, p. 278-282	1-9, 11-14 10
A	Stel H V et al. "von Willebrand Factor in the Vessel Wall Mediates Platelet Adherence", Blood, (1985), Vol. 65, No. 1, p. 85-90	1-9, 11-14 10
A	Sixma J J et al. "Functional Domains on von Willebrand Factor Recognition of Discrete Tryptic Fragments by Monoclonal Antibodies That Inhibit Interaction of von Willebrand Factor with Platelets and with Collagen", J. Clin. Invest., (1984), Vol. 74, No. 3, p. 736-744	1-9, 11-14 10
A	Katzmann J A et al. "Mono Clonal Antibodies to von Willebrands Factor Reactivity with Porcine and Human Antigens", Blood, (1981), Vol. 58, No.3, p. 530-536	1-9, 11-14 10
A	Kobayashi S et al. "Intrahepatic Peribiliary Vascular Plexus in Various Hepatobiliary Diseases : a Histological Survey", Human Pathology, (1994) Vol. 25, No. 9, p. 940-946	1-9, 11-14 10
A	Chow T W et al. "Shear Stress-induced von Willebrand Factor Binding to Platelet Glycoprotein IB Initiates calcium Influx Associated with Aggregation", Blood, (1992), Vol. 80, No. 1, p. 113-120	1-9, 11-14 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/02435

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1 to 9 and 11 to 14 relate to the inventions pertinent to the monoclonal antibodies that are reactive with human vWF and inhibit human RIPA, BIPA and SIPA, while claim 10 relates to the invention pertinent to the monoclonal antibody that is reactive with human vWF and inhibits, when it is present together with the monoclonal antibody as set forth in claim 6 or 9, the binding of such an antibody with human vWF.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁶ C12P21/08, C12N5/20, C07K16/36 // A61K39/395, (C12P21/08, C12R1:91)		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁶ C12P21/08, C12N5/20, C07K16/36 // A61K39/395, (C12P21/08, C12R1:91)		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P	Yamamoto H et al. "Monoclonal Antibody Against von Willebrand Factor Inhibits Thrombus Formation Without Prolongation of Breeding time", Blood, (1995), 10 suppl.1, p.84A	1-9, 11-14 10
A	Fujiyama Y et al. "The Interaction of Botrocetin with normal or Variant von Willebrand Factor Types IIA and	1-9, 11-14 10
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
27. 02. 96	96.03.96	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 大久保元浩 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 8 8 2 8

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	IIB and Its Inhibition by Monoclonal Antibodies that block Receptor Binding", Thromb. Haemostasis, (1992), 第68巻, 第4号, p. 464-469	
A	Fujimura Y et al. "Studies on Anti-von Willebrand Factor vWF Monoclonal Antibody NMC-4 Which Inhibits Both Ristocetin-Induced and Botrocetin-Induced vWF Binding to Platelet Glycoprotein IB", Blood, (1991), 第77巻, 第1号, p. 113-120	1-9, 11-14 10
A	Pletu G et al. "Production in Escherichia-coli of a Biologically Active Subfragment of von Willebrand Factor Corresponding to the Platelet Glycoprotein IB Collagen and Heparin Binding Domains", Biochem. Biophys. Res. Commn., (1989) 第164巻, 第3号, p. 1339-1347	1-9, 11-14 10
A	Aihara M et al. "Glycoprotein IB Has a Partial Role in Platelet-von Willebrand Factor Collagen Interaction", Thromb. Haemostasis, (1988), 第60巻, 第2号, p. 182-187	1-9, 11-14 10
A	Jorieux et al. "Characterization of a Monoclonal Antibody to von Willebrand Factor as a Potent Inhibitor of Ristocetin-Mediated Platelet Interaction and Platelet Adhesion", Thromb. Haemostasis, (1987), 第57巻, 第3号, p. 278-282	1-9, 11-14 10
A	Stel H V et al. "von Willebrand Factor in the Vessel Wall Mediates Platelet Adherence", Blood, (1985), 第65巻 第1号, p. 85-90	1-9, 11-14 10

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Sixma J J et al. "Functional Domains on von Willebrand Factor Recognition of Discrete Tryptic Fragments by Monoclonal Antibodies That Inhibit Interaction of von Willebrand Factor with Platelets and with Collagen", J. Clin. Invest., (1984), 第74巻, 第3号, p. 736-744	1-9, 11-14 10
A	Katzmann J A et al. "Mono Clonal Antibodies to von Willebrands Factor Reactivity with Porcine and Human Antigens", Blood, (1981), 第58巻, 第3号, p. 530-536	1-9, 11-14 10
A	Kobayashi S et al. "Intrahepatic Peribiliary Vascular Plexus in Various Hepatobiliary Diseases : a Histological Survey", Human Pathology, (1994) 第25巻, 第9号, p. 940-946	1-9, 11-14 10
A	Chow T W et al. "Shear Stress-induced von Willebrand Factor Binding to Platelet Glycoprotein IB Initiates calcium Influx Associated with Aggregation", Blood, (1992), 第80巻, 第1号, p. 113-120	1-9, 11-14 10

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの1の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4（a）の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの2の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

・請求の範囲1-9, 11-14

ヒトvWF 因子に対して反応性を有し、ヒト血小板のRIPA, BIPA, SIPAを阻害する作用を有するモノクローナル抗体に係る発明

・請求の範囲10

ヒトvWF 因子に対して反応性を有し、請求項6 または9 に記載のモノクローナル抗体と共存させたときに、これらのモノクローナル抗体とvWF 因子との結合を阻害する作用を有するモノクローナル抗体に係る発明

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。